



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

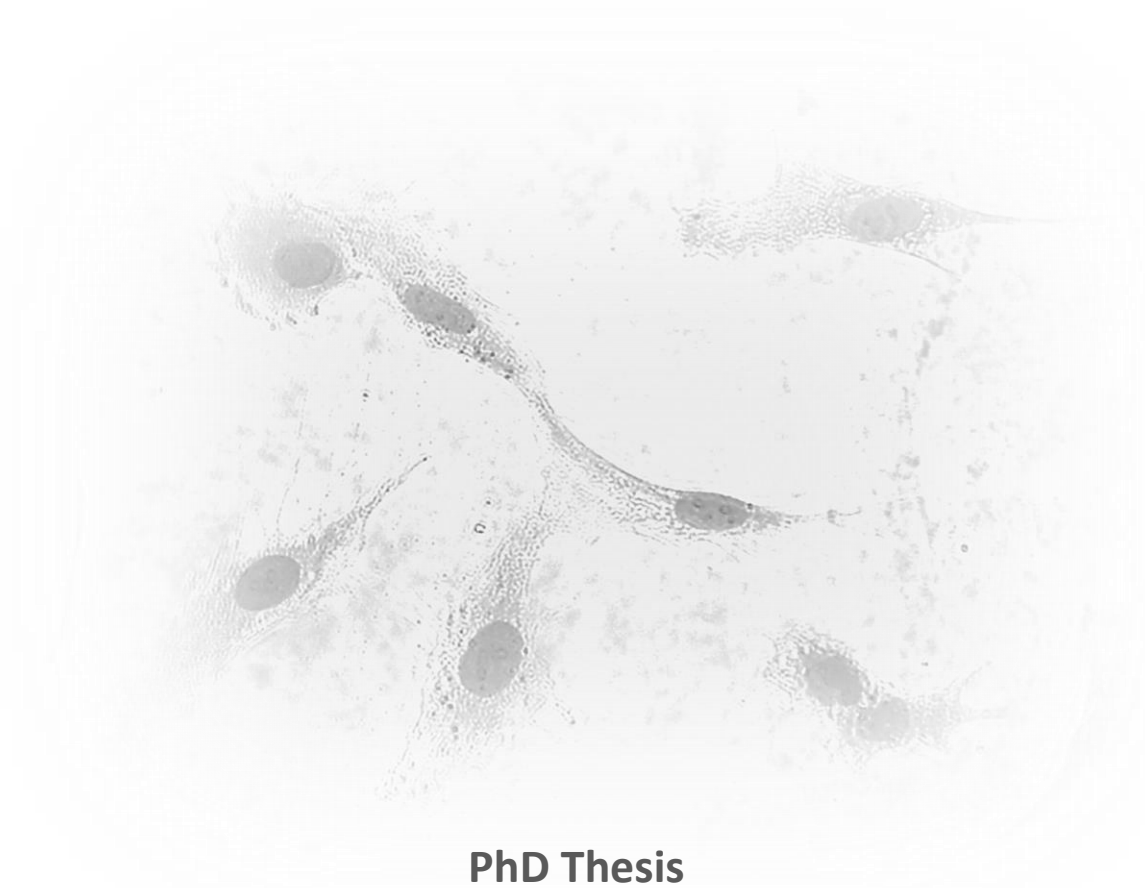
WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina

Tratamiento de la Gonartrosis
con
Células Mesenquimales Troncales
estudio comparativo con P-PRP



PhD Thesis
Ana Munar Sandström
Barcelona, 2016



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina

Tratamiento de la Gonartrosis
con
Células Mesenquimales Troncales
Estudio comparativo con P-PRP

Memoria presentada por Ana Munar Sandström

Dirigida por Lluís Orozco Delclós y Joan Carles Monllau García

Para optar al Grado de Doctor en Medicina

Barcelona, julio de 2016

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral fundamenta en ensayos clínicos y estudios en modelo animal en los que se ha tratado sobre terapia celular, habiendo implicado a laboratorios de diversas instituciones especializadas en la materia como son el *Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid (IBGM)*, el *Banc de Sang i Teixits* de Barcelona (*BST*), o las Facultades de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y la Universidad Autónoma de Barcelona.

La mayoría de estos estudios se han desarrollado en el marco de colaboración entre grupos de la *Red TerCel del Instituto de Salud Carlos III* y han sido valedores de ayudas a la investigación ya sean gubernamentales o de distintas instituciones públicas y privadas como *Fundación Teknon* o *Egarsat*. Mi agradecimiento por el esfuerzo realizado a los investigadores de todas estas entidades que nos han precedido.

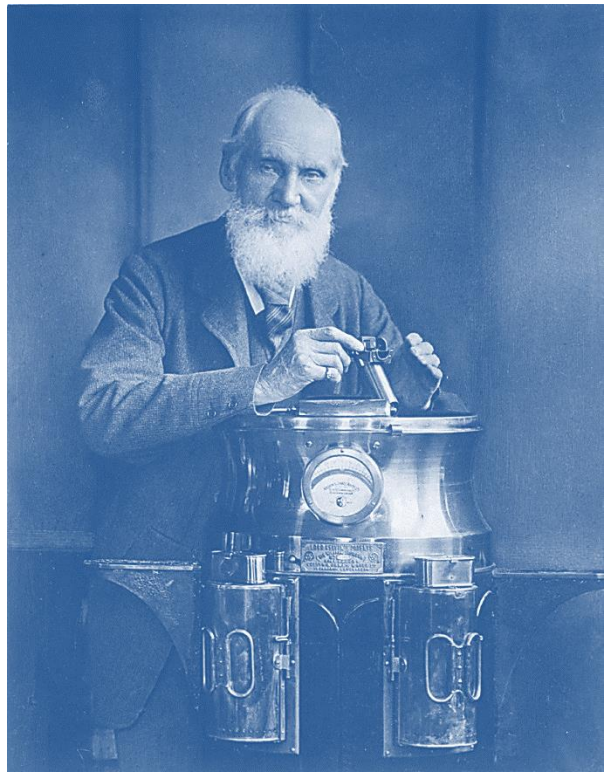
La Tesis Doctoral se ha prolongado en un tiempo paralelo a la puesta a punto del análisis del cartílago mediante el procedimiento de resonancia magnética nuclear T2 mapping. Es un área del conocimiento que se escapa en gran parte de mi formación, sin embargo hemos avanzado con el soporte de la Dra. Marina Huguet y el Dr. Juan Carlos Vilanova; directores de los Departamentos de Resonancia Magnética de *Clínica del Pilar* y *Clínica Girona* respectivamente.

El diseño y desarrollo de la Tesis tiene un gran contenido estadístico. Desde su inicio nos ha proporcionado su consejo incondicional el Prof. Juan Sentís; Catedrático de Bioestadística, al que seguramente he importunado excediendo el límite prudencial. Agradezco su enorme paciencia y dedicación. También la del Dr. Oliver Valero del *Servicio de Estadística de la UAB* y del Prof. Antoni Planas del *Departamento de Estadística del INEFC de Lleida*, con los que he finalizado el análisis estadístico y confirmado la fiabilidad de los resultados.

A todos mis compañeros del equipo facultativo y administrativo del *Institut de Teràpia Regenerativa Tissular* de *Centro Médico Teknon (ITRT)*; ellos han impulsado esta línea de investigación y al ser primeros responsables de los tratamientos realizados son lo que más han soportado mis insistencias por motivo de este trabajo.

Redoblado agradecimiento por su gran dedicación, buenos consejos y espíritu didáctico a los Doctores Lluís Orozco y Joan Carles Monllau; Director Científico del ITRT y Jefe del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del *Hospital del Mar* respectivamente. Ellos han cargado con la responsabilidad de dirigir este trabajo y asistir a la redacción de esta Memoria.

Para finalizar, que no en último lugar, un recuerdo emocionado del Profesor Maurice Müller y el Doctor Rafael Orozco y mi agradecimiento innecesario pero del que deseo dejar constancia, a mi marido y mis hijas, nacidas en el ambiente apasionado de la investigación clínica que vivíamos en la *Fundación Maurice Müller*, quizás por esto han tolerado con tan buen ánimo mis muchas ausencias motivadas por esta Tesis Doctoral.



«Cuando puedes medir eso de lo que hablas y expresarlo en números, sabes algo acerca de ello; pero cuando no lo puedes expresar en números, tu conocimiento es pobre e insatisfactorio»

Lord Kelvin
(1824 - 1907)

ABREVIACIONES

AA	Acontecimiento adverso
AAOS	American Academy of Orthopaedic Surgeons
AAG	Acontecimiento adverso grave
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
BMP	Proteína morfogenética ósea
BPC	Buena Práctica Clínica
BPL	Buena Práctica de Laboratorio
BST	Banc de Sang i Teixits
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
CDC	Center for Disease Control
CE	Conformité Européene
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de morfología fibroblástica
CMN	Células mononucleadas
COMP	Proteínas de la matriz oligomérica cartilaginosa
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CRD.....	Cuaderno de Recogida de Datos
CRO	Clinical Research Organization
CEEAH	Comité Ético de Experimentación Animal y Humana
CI	Consentimiento Informado
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Da	Dalton
DE	Desviación estándar
dGEMRIC	Delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage
DMOAD	Disease Modifying Osteoarthritis Drugs
DS	Diferencias significativas
EC	Ensayo Clínico
ECA	Ensayo Clínico Aleatorizado
ENA	Ensayo no aleatorizado
FBS	Suero fetal bovino
FC	Factores de Crecimiento
FDA	Federal Drug Administration
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FVS.....	Fracción Vasculor Estromal
GAG	Glucosaminoglicano
GMENA	Grupo Cochrane para Ensayos no aleatorizados
HA	Hialuronano
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IBGM	Instituto de Biología Genética Molecular

ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukina
ISCT.....	Sociedad Internacional de Terapia Celular
kDa	Kilo Dalton
K-L	Kellgren y Lawrence
LCA	Ligamento cruzado anterior
L-PRP	Plasma Rico en Plaquetas pobre en Leucocitos
LSN	Límite Superior Normal
MEC	Matriz extracelular
MNC	Células mononucleadas
MMP	Metaloproteinasas
MO	Médula Ósea
ms	Milisegundos
MSC	Células Mesenquimales
NCF	Normas de Correcta Fabricación
NIH	National Institute Health
Nm	Nanómetro
OAI	Osteoarthritis Initiative
OARSI	Sociedad Internacional para el Estudio de la Artrosis
OCATT	Organización Catalana de Trasplantes
ON	Óxido Nítrico
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEI	Producto en Investigación
PIA	Presión intrarticular
PG	Proteoglicano
PM	Peso molecular
PNT	Procedimientos Normalizados de Trabajo
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
QC	Control de Calidad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROI	Region of Interest
SDV	Verificación de los datos fuente
T	Tesla
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TKR	Receptor tirosina-kinasa
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UAB	Universidad Autónoma de Barcelona
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

RESUMEN

Antecedentes: Las células mesenquimales (MSC) y el Plasma Rico en Plaquetas bajo en leucocitos (P-PRP) se postulan como tratamientos para la artrosis (OA). Aunque sus efectos anabólicos sobre los condrocitos in vitro están bien documentados, se sabe poco sobre sus acción sobre el cartílago artrósico in vivo. Dado que la artrosis se caracteriza por un entorno inflamatorio y catabólico, hemos estudiado si las MSC son capaces de contrarrestar los efectos de este ambiente agresivo en rodillas humanas afectas de artrosis grado II-IV in vivo, comparando los efectos con los del PRP mediante cuestionarios algofuncionales y T2 mapping para evaluar la modificación de la estructura del cartílago.

Método: Hemos comparado los efectos de una infusión intrarticular de 40×10^6 de MSC de médula ósea autóloga, expandidas y cultivadas bajo Normas de Correcta Fabricación (NCF) con 4 inyecciones intrarticulares de P-PRP administradas a intervalos de 15 días para el tratamiento de gonartrosis grado II a IV.

Reclutamos 12 sujetos para cada grupo. Se evaluó la evolución del dolor y la funcionalidad mediante cuestionarios EVA, Lequesne y WOMAC, y la modificación de la estructura del cartílago por la Media, la DE y el estudio por compartimentos de los valores T2 mapping a 1,5 T. Dividimos la superficie del cartílago en 88 ROI (32 para cóndilos tibiales, 32 para cóndilos femorales y 24 para rótula). El período de seguimiento fue de 12 meses.

En este estudio prospectivo los datos han sido apareados para edad, sexo, IMC, grado de K&L y EVA basales. Dado que el cegamiento no fue posible, tratamos de controlar los sesgos potenciales mediante la elaboración de la lista TREND para ensayos clínicos no aleatorizados.

Resultados: El P-PRP mejoró de forma significativa el dolor y la funcionalidad. La diferencia más significativa se alcanzó a los 6 meses, manteniéndose a los 12 meses sin mayor mejoría. En cambio las MSC mejoraron de forma significativa el dolor y la funcionalidad tanto a los 6 como a los 12 meses.

El P-PRP mejoró la media T2 de forma no significativa, mostrando un incremento de la DE de los valores T2 y tampoco mejoró los valores T2 al evaluar los compartimentos de carga por separado. Las MSC mejoraron la media T2, disminuyeron la DE de los valores T2 globales y los valores T2 de los compartimentos de carga mejoraron de forma significativa comparado con el grupo PRP. Se observó una fuerte correlación entre el T2 mapping y el WOMAC en el grupo tratado con MSC, siendo la correlación débil para el grupo tratado con PRP.

Conclusiones: El PRP mejoró el dolor y la funcionalidad de las rodillas artrósicas a los 6 meses, perdiendo parte del efecto a los 12 meses. Las MSC mejoraron significativamente el dolor y la funcionalidad de las rodillas artrósicas, de forma más intensa y mantenida en el tiempo.

El PRP parece disminuir el contenido hídrico del cartílago y las MSC disminuir el contenido hídrico y modificar parcialmente la estructura del cartílago evaluado mediante T2 mapping a 1,5 T; los mecanismos responsables de esta modificación no están claros. Los datos presentados incentivan a profundizar en el estudio de los potenciales efectos en el tratamiento de la artrosis.

ABSTRACT

Background: Mesenchymal stem cells (MSC) and low leukocyte Rich-Platelet Plasma (P-PRP) have been postulated as treatments for osteoarthritis (OA). Although their anabolic effects on chondrocytes in vitro are well documented, little is known about the effects on cartilage degeneration in vivo. Since OA is characterized by a catabolic and inflammatory joint environment, we studied whether MSC were able to counteract the effects of such an environment on human osteoarthritic knees in vivo, comparing the effects with PRP. We assessed clinical improvement by means of algofunctional scores and cartilage structure modification by means of T2 mapping.

Methods: We compared the effects of an intrarticular injection of 40×10^6 Bone Marrow Autologous MSC expanded and cultured under GMP procedures vs 4 consecutive PRP injections with 15 days interval for the treatment of knee OA grade II-IV.

We recruited 12 subjects for each group. The clinical endpoint measures were pain and function evaluated with VAS, Lequesne Index and WOMAC, and cartilage structure endpoint measures were assessed by means of T2 mapping at 1,5T, dividing the knee cartilage surface into 88 ROIs (32 for tibial condyles, 32 for femur condyles and 24 for patella). The follow-up period was 12 months. This is a prospective study, patients were paired for age, sex, BMI, VAS and WOMAC at baseline. Since double blinding was not possible, we tried to control potential biases following the TREND Statement check list for non-randomized clinical trials.

Results: PRP significantly improved pain and function on human osteoarthritic knees, assessed by VAS, Lequesne and WOMAC. Maximum improvement was registered at 6 months, slightly regressing at 12 months. MSC significantly improved pain and function on human osteoarthritic knees assessed by VAS, Lequesne and WOMAC both at 6 and 12 months.

PRP slightly improved Global T2 mean, but increased the Standard Deviation of T2 values and we found no differences when assessing weight bearing compartments compared to the whole cartilage surface. MSC improved Global T2 mean, decreased the Standard Deviation of T2 values and the T2 values of medial compartments improved compared to PRP. We found a strong correlation between T2 mapping and WOMAC in the group treated with MSC, whereas the correlation was weak in the group treated with P-PRP.

Conclusions: PRP significantly improved pain and function on human osteoarthritic knees at 6 months, partially losing effect at 12 months. MSC significantly improved symptoms on human osteoarthritic knees at 6 months, further improving at 12 months.

PRP seems to decrease water content in OA cartilage while MSC seem to decrease water content and modify cartilage structure compared to PRP assessed by T2 mapping at 1,5T; the mechanisms leading to these changes remain unclear. Thereby, the presented data encourage further study of these therapies as a treatment for osteoarthritis.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Motivación del estudio y justificación de su diseño	1
1.2. Recuerdo de la anatomía y fisiopatología articular	4
1.3. Artrosis	14
1.3.1. Manifestaciones clínicas	16
1.3.1.1. Dolor	16
1.3.1.2. Derrame	17
1.3.2. Procedimientos diagnósticos	17
1.3.2.1. Radiografía.....	18
1.3.2.2. RMN	19
1.3.2.2.1. Biomarcadores	19
1.3.2.2.2. Biomarcadores de imagen	20
1.3.2.2.3. Concepto de tiempo de relajación T2	22
1.3.2.2.4. Técnica T2 aplicada en este estudio	26
1.3.2.2.5. Características del dispositivo RMN	27
1.3.2.2.6. Protocolo de adquisición	27
1.3.2.2.7. Variabilidad	27
1.3.2.2.7.1. Variabilidad del dispositivo.....	27
1.3.2.2.7.2. Variabilidad intraobservador.....	29
1.3.2.2.7.3. Variabilidad interobservador.....	31
1.3.3. Tratamientos de la gonartrosis	32
1.3.3.1. Tratamiento no farmacológico	32
1.3.3.2. Tratamiento farmacológico	33
1.3.3.2.1. Fármacos modificadores de los síntomas	33
1.3.3.2.2. Fármacos modificadores de la estructura del cartílago	34
1.3.3.2.3. Tratamientos intrarticulares	34
1.3.3.3. Tratamiento quirúrgico	36
1.4. Tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	37
1.4.1. Estudios en modelo animal, ensayos clínicos y tratamientos con P-PRP	39
1.4.2. Aspectos regulatorios de la terapia con PRP	41
1.5. Células Mesenquimales (MSC)	41
1.5.1. Selección y cultivo de MSC	44

1.5.2. Estudios en modelo animal	44
1.5.3. Ensayos clínicos y tratamientos sucesivos con MSC	46
1.5.4. Aspectos regulatorios de la Terapia Celular	46
II. HIPÓTESIS	49
III. OBJETIVOS	51
IV. MÉTODOS	53
4.1. Diseño del estudio	53
4.1.1. Grupos de pacientes	53
4.1.2. Criterios de inclusión y exclusión.....	54
4.1.3. Diagrama de flujo del reclutamiento	55
4.1.4. Programa de Seguimiento	56
4.1.5. Criterios de retirada de los pacientes.....	57
4.1.6. Criterios de reemplazamiento de los pacientes	57
4.1.7. Registro de Acontecimientos Adversos	57
4.2. Aspectos Éticos	59
4.2.1. Requisitos éticos y reguladores	59
4.2.2. Responsabilidades del Investigador	59
4.2.3. Consentimiento Informado	59
4.2.4. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)	59
4.2.5. Acceso a los datos del paciente	59
4.2.6. Responsabilidades del investigador	60
4.2.7. Cuaderno de recogida de datos (CRD)	60
4.2.8. Datos originales	60
4.3. Métodos Estadísticos	61
4.3.1. Variables del Estudio	61
4.3.2. Variables de eficacia clínica	61
4.3.3. Variables de eficacia regenerativa	63
4.4. Protocolo de obtención y aplicación del P-PRP	64
4.4.1. Material necesario	64
4.4.2. Proceso según orden cronológico	65
4.4.3. Validación del procedimiento de obtención de P-PRP	67
4.5. Protocolo de obtención y aplicación de las MSC	69
4.5.1. Obtención de médula ósea por punción-aspiración	69
4.5.2. Procesado Celular en la Unidad de Terapia Celular	70

4.5.3. Procedimiento de infusión intrarticular de las MSV	71
4.5.4. Pauta Postratamiento	71
V. RESULTADOS	73
5.1. Análisis de homogeneidad basal	73
5.2. Análisis de los cuestionarios	74
5.2.1. Estadísticos descriptivos EVA	74
5.2.2. Estadísticos descriptivos Lequesne	75
5.2.3. Estadísticos descriptivos WOMAC	76
5.3. Análisis T2 Mapping	77
5.3.1. Análisis de todos los valores T2	77
5.3.2. Análisis de los valores T2 patológicos	79
5.3.3. Análisis de la Desviación Estándar de los valores T2	80
5.3.4. Análisis zonal	84
5.3.5. Análisis de los compartimentos de carga.....	84
5.3.6. Análisis de correlaciones T2-WOMAC.....	86
VI. DISCUSIÓN	89
VII. CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFIA	99
ANEXOS	113
TREND Checklist	115
Gráficos Cartigram por paciente y grupo.....	118
Aprobación CEIC	123
Publicaciones	125

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Fisiopatología de la artrosis.	5
2. Interacción del condrocito con la MEC circundante	6
3. Estructura del cartílago hialino.	7
4. Interacción de los componentes de la MEC.....	9
5. Estructura del agregado de agregano	10
6. Mediadores del balance anabólico-catabólico del cartílago.....	11
7. Pérdida de celularidad, PG y colágeno en el proceso evolutivo de la artrosis.....	14
8. Clasificación de artrosis según Mankin y el Estadiaje según Otte	15
9. Escala radiológica de Kellgren-Lawrence.....	18
10. Imágenes obtenidas con los distintos biomarcadores de imagen.	21
11. Concepto del tiempo de relajación T2	22
12. Valores T2 bajos.....	23
13. Distribución de los valores de relajación T2.....	24
14. Variación zonal del cartílago.	24
15. Espesor del cartilago normal (mm) y T2 (ms) para distintos compartimentos.....	25
16. Ejemplo Mapa T2.....	26
17. Histograma de Distribución de las variables de 10 pacientes estudiados	30
18. Ejemplos de aplicación de PRP.	38
19. Aspecto del PRP	38
20. Bioinjerto de MSC expandidas.	39
21. Imagen de MSC de MO expandidas e incluidas en coágulo de PRP.	39
22. Efecto del P-PRP en el tiempo.....	40
23. Mesengénesis	42
24. Diagrama de flujo	55
25. Citometria de flujo del P-PRP.....	68
26. Diagrama de caja de la evolución del dolor por escala EVA.	74
27. Diagrama de cajas del índice de Lequesne (log)	75
28. Diagrama de cajas del índice WOMAC	76
29. Gráfico de barras de los 88 ROI según grupo y momento.....	78
30. Gráfico de cajas de los valores T2 patológicos según grupo y momento	80
31. Histograma del grupo PRP valores T2 hasta 99 ms.	81

32. Histograma del grupo MSC valores T2 hasta 99 ms.	82
33. DE del grupo PRP.	83
34. DE del grupo MSC.	83
35. Modificación de la media de los valores T2 a los 12 m para cada compartimento	84
36. Evolución de los valores T2 por compartimentos 0m-12m	85
37. Análisis de los valores T2 de los sub-compartimentos mediales	85
38. Diagrama de dispersión y recta de regresión según grupo entre T2-WOMAC.	86

ÍNDICE DE TABLAS

1. Fragmento de tabla para cálculo de la variabilidad en el análisis de los ROI.	28
2. Distribución de las variables en sujeto sano	28
3. Fragmento de tabla para el cálculo de la variabilidad intraobservador.....	29
4. Variabilidad intraobservador	30
5. Fragmento de tabla para el cálculo de la variabilidad interobservador	31
6. Variabilidad interobservador	31
7. Cronograma de seguimiento del grupo MSC	56
8. Cronograma de seguimiento del grupo P-PRP	56
9. Contenido plaquetario / leucocitario de PRP obtenido con diferentes sistemas.....	67
10. Concentración de plaquetas sangre-PRP.....	68
11. Estadísticos descriptivos de la edad.....	73
12. Estadísticos descriptivos del sexo	73
13. Estadísticos descriptivos de IMC.	73
14. Grados K & L. Distribución de los grados de artrosis en ambos grupos.....	73
15. Valores basales de los cuestionarios algofuncionales.....	74
16. Estadísticos descriptivos de la evolución del dolor por escala EVA.	74
17. Análisis intra grupos EVA	75
18. Estadísticos descriptivos del Índice de Lequesne (log)	75
19. Estadísticos descriptivos del índice WOMAC	76
20. Media del índice WOMAC por paciente.	76
21. Grupo PRP. Representación gráfica de todos los ROIs 0m-12m.	77
22. Grupo MSC. Representación gráfica de todos los ROIs 0m-12m.	77
23. Estadísticos descriptivos de los valores T2 de 45-99 ms de 0m a 12m	79
24. Evolución de la media y DE de los valores T2 de 45-99ms.	80
25. Estadísticos descriptivos de los valores T2 hasta 99ms	80
26. Variación zonal.....	84
27. Valores T2 (ms) de compartimento medial.	85
28. Correlación por grupos entre la variable WOMAC y T2	86

I. INTRODUCCIÓN

1.1. MOTIVACIÓN DEL ESTUDIO Y JUSTIFICACIÓN DE SU DISEÑO

La artrosis es la enfermedad más prevalente de todas las reumatológicas, se considera la segunda causa de incapacidad permanente en los países desarrollados. La gonartrosis es la forma más común de artrosis; presenta una prevalencia superior al 10% en mayores de 20 años situándose alrededor del 65% en la sexta o séptima década de la vida (Fernández-López 2008; Arden 2006).

En nuestro medio se estima que se producirá un crecimiento de los costes derivados de esta patología del 3% por año y paciente que se explica por acercarse a la jubilación el grupo etario de la generación de la explosión demográfica además de los avances relativos a tratamientos farmacológicos y las intervenciones quirúrgicas que incrementan sustancialmente el gasto en la atención de esta enfermedad (Le Pen 2005; Sharma 2006, Richette 2008).

La elevada prevalencia e impacto social han incentivado el desarrollo de múltiples opciones terapéuticas para frenar o retardar su progresión aunque, hasta la fecha, se considera que ninguna ha conseguido regenerar el cartílago hialino articular.

El exponente máximo de la terapia sobre gonartrosis avanzadas con repercusión clínica importante es el reemplazo articular. En todo el mundo se practican unas 500.000 artroplastias de rodilla al año (Kurtz 2011). Esta solución quirúrgica, radical pero muy efectiva, no está exenta de complicaciones y es una opción especialmente problemática en pacientes jóvenes ya que las prótesis articulares presentan un tiempo de vida limitado y el reemplazo articular protésico presenta mayor morbilidad además de ser un procedimiento más costoso que la prótesis primaria (McIlwraith 1996), lo que justifica explorar nuevos métodos terapéuticos que quizás puedan resultar más eficaces que los actuales, permitiendo demorar o incluso evitar la cirugía.

Las células troncales mesenquimales (MSC) ofrecen una posibilidad terapéutica por su potencial regenerativo y antiinflamatorio cuando son administradas a altas dosis, aunque exigen un proceso de selección y cultivo siguiendo altos estándares farmacéuticos que complica y encarece su aplicación. Por otro lado, el plasma rico en plaquetas con bajo contenido leucocitario (P-PRP) es un producto de fácil obtención y poco coste que en nuestra experiencia ha resultado una buena arma terapéutica para esta patología, comportándose como un eficaz antiinflamatorio a dosis determinadas aunque dudoso o nulo potencial regenerativo del cartílago.

«*Institut de Teràpia Regenerativa Tissular (ITRT)*» del Centro Médico Teknon, presta especial dedicación a explorar el potencial terapéutico de las MSC y del P-PRP en distintas patologías del aparato locomotor, entre ellas la gonartrosis.

Como investigadora y responsable de su Centro de Documentación y Farmacovigilancia se encuentra entre mis funciones el seguimiento del curso clínico de los pacientes, la cumplimentación correcta y completa de los formularios que determinan los protocolos, su registro y ubicación adecuada en los cuadernos de registro de datos (CRD) a los que posteriormente acceden los investigadores del equipo, responsables de la monitorización o de las *Clinical Research Organization (CRO)*. Estos documentos que considero de valor excepcional por contener datos de estudios pioneros en terapia regenerativa quedan a disposición permanente de las autoridades sanitarias.

Hemos desarrollado estudios en modelo de gran animal y ensayos clínicos, seguidos de una serie de tratamientos realizados previa autorización y bajo control de la «Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)», determinando la viabilidad, la seguridad de uso e indicios de eficacia antiinflamatoria y regenerativa sobre el cartílago de rodillas artrósicas tras

la infusión intrarticular de una suspensión con alto contenido de células mesenquimales de médula ósea, seleccionadas y cultivadas bajo Normas de Correcta Fabricación (NCF).

Las MSC, obtenidas por aspirado de médula ósea, son procesadas bajo NCF del «Instituto de Biología Genética Molecular de Valladolid (IBGM)», centro dependiente de la Universidad de Valladolid y el CSIC o en «XCELIA» que es la Unidad de Terapias Avanzadas del «*Banc de Sang i Teixits (BST)*» de Barcelona, centro dependiente del «*Servei Català de Salut de la Generalitat de Catalunya*».

Los estudios en modelo animal se realizan en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Las publicaciones derivadas de esta experiencia se adjuntan a esta Memoria.

Cumplida la hipótesis planteada en estos ensayos fase I-II, correspondería realizar ensayos en fase III, controlados, aleatorizados (ECA), incluyendo un mayor número de pacientes que son los que aportan mayor evidencia científica, con frecuencia se considera que los demás diseños aportan poco valor.

De acuerdo con el «TREND Group» creemos que no cabe duda que la medicina basada en la evidencia debe incluir datos de estudios con diseños quías experimentales o ensayos clínicos no aleatorizados porque también pueden contribuir al avance del conocimiento aportando datos relevantes sobre eficacia y seguridad.

Excluir los datos de este tipo de estudios que evalúan de forma efectiva ciertos tratamientos y sobre los que los ECA no son más coste-efectivos, supone asumir un grave sesgo de la evidencia real. Incluirlos como parte de medicina basada en la evidencia sirve para elaborar guías y recomendaciones ya que aportan una visión más completa de la evidencia que redundan en la mejora de la práctica clínica (Des Jarlais 2004).

Especialmente en terapia celular, los ECA se ponen en cuestión por diversas razones, algunas de carácter ético, otras de procedimiento como por la imposibilidad de realizar un cegamiento razonable y fundamentalmente económico; el alto coste de los cultivos celulares, sumados a los derivados del tratamiento y del seguimiento, que por definición son gratuitos para el paciente en el contexto de ensayos clínicos, pueden llegar a resultar inasumibles incluso para grandes empresas farmacéuticas.

Se han efectuado muchos esfuerzos para garantizar la calidad de los ECA a través del *CONSORT statement* y otras iniciativas similares, adoptadas por sistemas de salud públicos y utilizados como herramientas para los revisores de numerosas publicaciones científicas. Sin embargo no existía un marco consensuado para los informes de estudios no aleatorizados.

En el año 2003 los editores de 18 revistas científicas y miembros del CDC «*Center for Disease Control*» acordaron un documento de consenso para garantizar la transparencia y homogeneidad de los datos aportados (<http://www.cdc.gov/trendstatement/>). Siguiendo sus recomendaciones, completamos la lista de comprobación adjunta en el Anexo I.

La reglamentación europea (CE) Nº 1394/2007 y Nº 668/2009, así como el RD 477/2014 que regulan la «Autorización de Uso» de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial, plantean que el equipo investigador, una vez determinada la viabilidad, seguridad e indicios de eficacia del procedimiento, puede seguir practicando el tratamiento sobre una serie continuada de pacientes, siempre previa autorización y bajo control continuado de la Administración, en nuestro caso la AEMPS.

Sin embargo mantenemos el máximo interés en generar evidencia científica de eficacia y entendemos que el avance en el conocimiento y la aproximación a la evidencia pueden alcanzarse

comparando dos procedimientos terapéuticos, siguiendo los mismos métodos de medición aunque obviando el cegamiento y la aleatorización.

Acorde con las recomendaciones de la «Asociación Médica Mundial» se ha desestimado el placebo y optado por aplicar el P-PRP como tratamiento usado en el brazo control.

En sus declaraciones de Helsinki de 1964, 1990 y 2002, la Asociación insiste sobre la importancia de escoger preferentemente un tratamiento alternativo de eficacia probada si estuviera disponible ante el placebo. Nuestro grupo investigador dispone de experiencia satisfactoria en el uso del plasma rico en plaquetas y pobre en leucocitos (P-PRP) aplicado con intención antiinflamatoria en el tratamiento de la gonartrosis, uso fundamentado en estudios previos en modelo animal y ensayos clínicos. Otros autores corroboran esta eficacia, superior a la obtenida con otros productos de uso habitual como el ácido hialurónico (Kon 2011, Filardo 2012, Vaquerizo 2013; Sundman 2014, Liu 2014). Pero la disparidad entre los métodos de obtención y aplicación de los dos tratamientos comparados dificulta mucho, sino imposibilita, el cegamiento y la asignación aleatoria de los pacientes a cada uno de los tratamientos.

El tratamiento con MSC consta de dos intervenciones, la extracción de médula ósea en ambiente quirúrgico bajo sedación y la infusión celular intrarticular 21-23 días después.

El tratamiento con PRP implica la extracción de sangre periférica del paciente, centrifugado, preparación del producto y su aplicación inmediata. El procedimiento se repite cuatro veces a intervalos de 15 días.

Se ha tenido en cuenta que la ausencia de aleatorización y control de los factores de confusión pueden proporcionar información sesgada. Los sesgos potenciales son: el sesgo de selección, relativo a diferencias entre individuos de los diferentes grupos de intervención y el sesgo de notificación, relativo a los estudios que no informan explícitamente al paciente o no han sido precedidos de un protocolo.

El **sesgo de selección** se considera la diferencia principal entre los ensayos aleatorizados y los no aleatorizados. Los factores de confusión aparecen si hay desequilibrios entre los grupos experimental y control en cuanto a los factores pronósticos y estos factores se asocian con el resultado.

En este estudio tratamos de controlar el sesgo mediante la estratificación de las características basales de los pacientes de ambos grupos para las variables: edad, sexo, grado de artrosis, IMC y WOMAC basal.

El **sesgo de notificación** intenta minimizarse. Elaboramos un protocolo previo al estudio y «Hojas de Información» y «Consentimiento Informado» para los pacientes a los que no se les notifica en ningún momento los resultados hasta finalizar el estudio.

Siguiendo los cuatro criterios propuestos por Reeves, para que la validez del mismo no se viera amenazada y controlar los sesgos que invalidarían las conclusiones del estudio, comprobamos que fueran adecuadas las características del diseño: el grupo comparativo, la metodología de creación de los grupos test y control, las partes del estudio comparativas y las variables en las que se evalúa la comparabilidad (Reeves 2013).

Tras homogeneizar las características basales se compararon los resultados clínicos y los obtenidos mediante imágenes de RMN.

El grupo experimental fue el punto de partida. En esta muestra se incluyeron parte de sujetos incluidos en el ensayo clínico identificado con el N° Eudra-CT: 2009-017405-11 y otros tratados como “uso compasivo” bajo control de la AEMPS, al que se asignaron individualmente los 12 individuos del grupo control según equivalencia de características basales (edad, sexo, grado de artrosis, IMC, índices algofuncionales). Todas las partes del estudio son prospectivas. La identificación de los participantes, la evaluación inicial, la asignación a la intervención y la evaluación de los resultados.

1.2. RECUERDO DE LA ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA ARTICULAR

La correcta función de las articulaciones sinoviales depende de la integridad anatómica y de la función celular de cada uno de sus componentes: cartílago articular, membrana sinovial, líquido sinovial, hueso subcondral, cápsula articular y estructuras ligamentosas.

Clásicamente se han propuesto distintos mecanismos patogénicos de la artrosis, tales como un cartílago defectuoso con propiedades biomecánicas alteradas, la presencia de cambios anormales en el hueso subcondral, insuficiencia ligamentosa que puede motivar inestabilidad y la distribución anormal de cargas o la exposición del cartílago a sobrecarga que a su vez provoca una respuesta del hueso subcondral. La fibrosis de la cápsula articular puede reducir la movilidad articular y dificultar el riego sanguíneo de la articulación, afectando a la homeostasis de la membrana sinovial, líquido sinovial y el cartílago articular.

Se sabe que la aplicación de fuerzas intensas sobre explantes de cartílago articular desencadena fenómenos apoptóticos y degradación de la matriz (D'Lima 2001) y que la sobrecarga mecánica en general induce la artrosis, pero el conocimiento de la fisiopatología de la artrosis ha progresado notablemente en los últimos tiempos, huyendo de la concepción puramente «mecanicista», apareciendo como una enfermedad esencialmente bioquímica, desencadenada por factores como los citados aunque considerando la principal característica el desequilibrio entre los fenómenos que rigen la degradación de la matriz y los que lo intentan reparar. Por esto muchos autores, aun reconociendo que a veces el proceso que conduce a la artrosis puede tener origen en algún tejido concreto de los que componen la articulación, prefieren mantener una visión más integral ya que en la enfermedad clínica suelen estar involucrados varios de los tejidos articulares y cuando la artrosis progresa la afectación puede generalizarse a todos ellos.

La membrana sinovial, el cartílago, incluso el hueso subcondral, pueden producir sustancias catabólicas como prostaglandinas, óxido nítrico, citoquinas, TNF α y MMP que degradan el colágeno tipo II, el agregano y otras glicoproteínas de la matriz cartilaginosa.

Aunque el desequilibrio puede producirse de forma progresiva o repentina, la evolución del proceso no suele ser lineal, quedando sometida a la influencia de los episodios de inflamación de la membrana sinovial. Puede ser muy lenta e incluso estabilizarse durante muchos años, lo que explica en parte la frecuente disociación que existe entre los estudios radiográficos y la clínica (Dougados 1992; Denison 2003; Ayrál 2005).

Al iniciarse el proceso existe una tentativa del organismo de reparar las lesiones mediante la acción de distintos factores anabólicos que conlleva la aparición de condrocitos hipertróficos y aumento de producción de colágeno tipo II, más evidente en la zona de las primeras fisuras (Lorenz 2006), pero el fenómeno finalmente desfallece con la acumulación de colágeno (I y III) y fibronectina, mientras que los condrocitos entran en estado apoptótico y predomina el catabolismo. La liberación de fragmentos de la matriz a la cavidad articular favorece la sinovitis, liberación de citoquinas y proteasas al líquido articular, cerrando el círculo vicioso de la artrosis que tiende a la inevitable destrucción progresiva del cartílago.

Interesa pues destacar que la artrosis afecta al conjunto de la articulación y no sólo al cartílago, aunque intentar corregir el desequilibrio tomando como diana una parte del conjunto articular también puede resultar una buena alternativa terapéutica y ha de tomarse en consideración.

Aproximadamente el 60% de las alteraciones artrósicas radiográficamente avanzadas se acompañan de síntomas, por tanto la prevalencia de artrosis, definida según criterios radiográficos y clínicos, es mucho menor que si se contemplan los hallazgos radiográficos de

forma aislada (Anderson 1988). También cabe destacar que el deterioro del cartílago hialino articular asociado al envejecimiento es un proceso universal que no es sinónimo de artrosis.

Algunas personas nunca desarrollan artrosis con repercusión clínica en las localizaciones más frecuentes como las rodillas y las caderas, lo que prueba que además de la edad hay otros factores que determinan la aparición de la enfermedad (Mitrovic 1987).

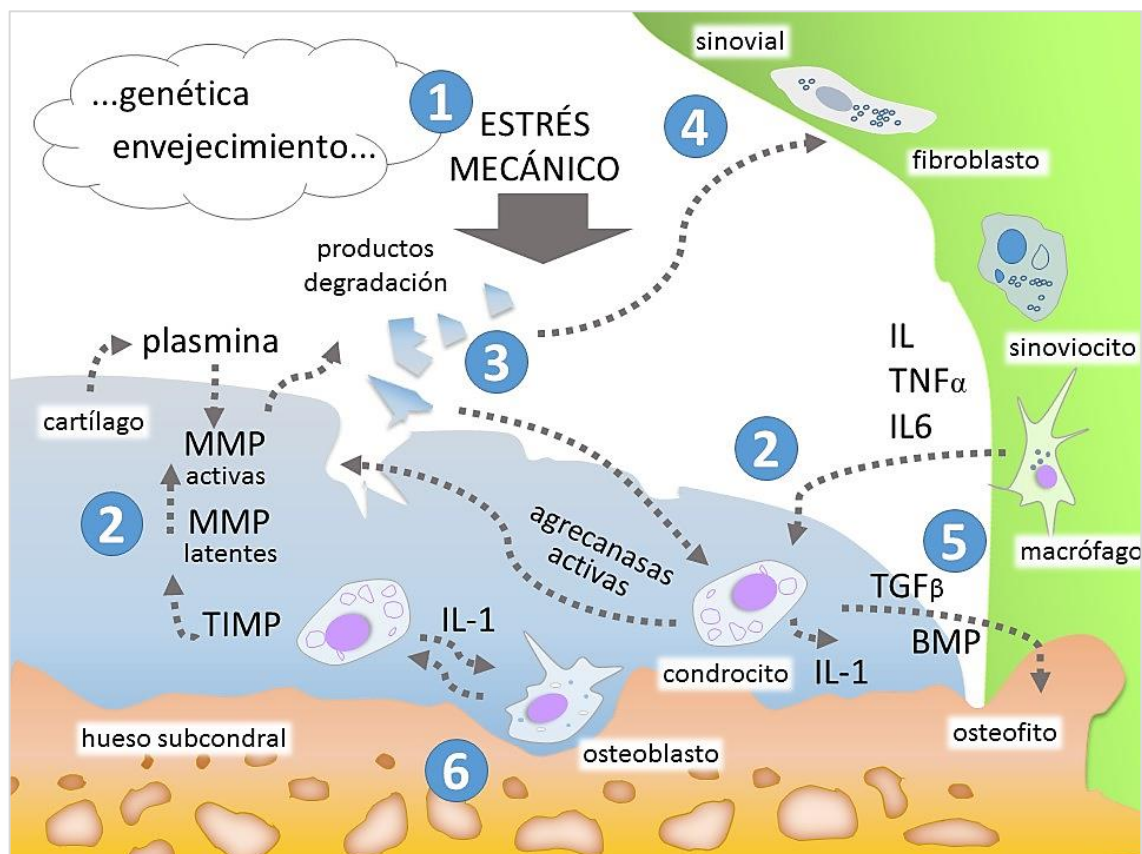


Fig. 1. Fisiopatología de la artrosis. (ITRT según idea de Chevalier. EMC 14-003-C-10).

1. Las solicitaciones mecánicas modifican el metabolismo del condrocito que en un inicio responde hipertrofiándose y libera IL-1β.
2. Bajo la acción de citoquinas, se liberan numerosos enzimas en el seno de la MEC. Las agreganasas y MMP degradan los PG.
3. Degradación progresiva de la matriz por el hipercatabolismo. Liberación de fragmentos (colágenos, proteoglicanos, fibronectina) que contactan con la membrana sinovial activando los sinoviocitos y macrófagos.
4. Producción paracrina de citoquinas y MMP que se vierten al líquido sinovial y activan los condrocitos de la capa superficial: «círculo vicioso de la artrosis».
5. Producción por los condrocitos de FC: TGF-β; BMP; FGF; IGF. TGF-β y BMP son anabólicos pero contribuyen a la formación de osteofitos.
6. Remodelado del hueso subcondral. Los osteoblastos en la artrosis son activados y a su vez contribuyen a activar los condrocitos de las capas profundas.

El cartílago articular presenta un grosor de entre 1 y 4 mm. Su color puede variar de blanco opaco a rosado por la transparencia del color del hueso subcondral.

Carece de red vascular, linfática y nerviosa, por lo que su nutrición, así como la eliminación de residuos metabólicos, se realiza por difusión. Los vasos sanguíneos de la subíntima sinovial proporcionan los solutos nutricionales, que difunden a través de la íntima hasta el líquido sinovial y desde éste, a través de la matriz extracelular del cartílago, llegan a los condrocitos.

La falta de irrigación genera un entorno con tensión baja de oxígeno, un 1% comparada con el 24% atmosférico, lo que obliga al condrocito a obtener energía por glicolisis anaerobia.

El lactato generado durante la glicolisis, induce a la célula sinovial a liberar glucosa, asegurándose la nutrición en ambiente anaerobio. Si el proceso se desborda, los condrocitos utilizan la vía oxidativa (aerobia) recurriendo a la MEC adyacente para la combustión.

La actividad metabólica individual del condrocito es elevada pero debido a la baja celularidad, la actividad metabólica total del tejido es baja.

La estructura del cartílago se compone de células, matriz extracelular y de una parte inorgánica. Está compuesto por agua (80%), condrocitos (1-12 %) y matriz extracelular, a su vez compuesta por colágeno tipo II (15–20%) que asegura la resistencia a las fuerzas de compresión y tensión. Entre la malla de colágeno se disponen los proteoglicanos (PG 3–10%) con gran potencial hidrófilo. El conjunto formado por colágeno y proteoglicanos es solidarizado por moléculas que forman el «pegamento» intercolagénico.

En el espacio intercelular que rodea al condrocito se expresa el lenguaje de interacción entre la célula y la matriz. Los receptores transmembrana de la superficie de los condrocitos son la correa de transmisión, la vía de transducción de señales, que condicionan el mantenimiento o alteración del metabolismo, la supervivencia o la apoptosis y la diferenciación fenotípica del condrocito.

La combinación adecuada de todos los componentes confiere propiedades viscoelásticas al cartílago, esenciales para su correcto funcionamiento.

En fases iniciales, la degeneración del cartílago se caracteriza por la desestructuración de la matriz de colágeno y la depleción de PG, que resultan en un incremento tanto del contenido como de la movilidad de las moléculas de agua (Dijkgraaf 1995; Burstein 2009).

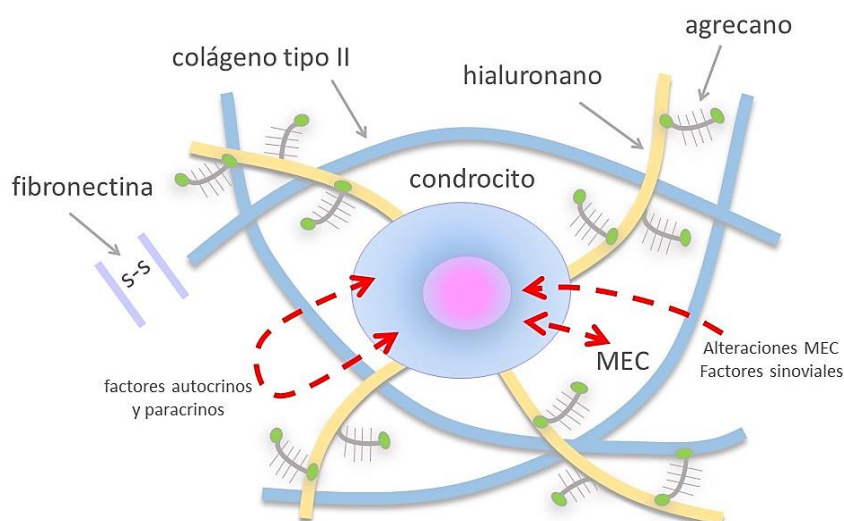


Fig. 2. Interacción del condrocito con la MEC circundante

El examen microscópico del espesor del cartílago revela 4 zonas contiguas que se diferencian por la morfología de los condrocitos y la orientación de las fibras de colágeno.

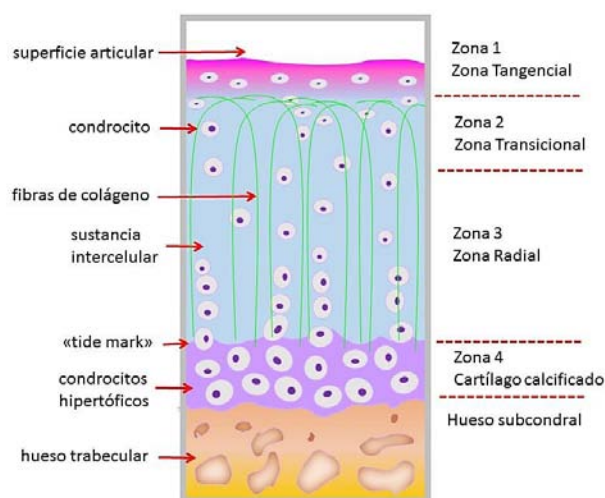


Fig. 3. Estructura del cartílago hialino.

La zona superficial o tangencial (10%-20% del espesor del cartílago), es la que presenta una mayor concentración de condrocitos, que tienen una forma alargada y están dispuestos de tal forma que su axis mayor mantiene un paralelismo con la superficie articular. Se acepta la existencia de una lámina acelular de colágeno sobre la superficie de esta zona, débilmente unida al estrato celular de la misma. Es rica en agua y pobre en proteoglicanos.

La superficie del cartílago presenta poros de un diámetro aproximado de 6 nm que permiten el paso de algunos solutos (iones, glucosa, etc).

La zona intermedia o transicional (40%-60% del espesor del cartílago) se distingue por los condrocitos de mayor tamaño y una morfología más ovoidea o redondeada; las fibras de colágeno se disponen de forma más aleatoria u oblicua respecto a la superficie articular.

La zona transicional es más gruesa en la periferia de la articulación, donde el cartílago es sometido a fuerzas de tracción y cizallamiento.

La zona profunda o radial (30% del espesor del cartílago) se distingue porque incluye los condrocitos de mayor tamaño, de morfología algo alargada y orientados perpendicularmente a la superficie articular; En los compartimentos de carga predomina la zona radial, más rica en PG y con fibras de colágeno más gruesas y orientadas perpendicularmente a la superficie, más resistentes a la compresión, en cambio la zona transicional es más fina. Este patrón no se observa en áreas no sometidas a cargas de manera regular (Moger 2007; Choi 2011; Chen 2016).

La zona de cartílago calcificado es adyacente al hueso subcondral que actúa como elemento de anclaje al mismo. Está separada de la anterior por la «línea de flujo» o «tidemark», de 5 μm de grosor, una barrera ondulada con fibras de disposición tangencial que permite soportar fuerzas de cizallamiento. Está compuesta por matriz calcificada, presenta escasa celularidad y no contiene PG.

Los condrocitos de las capas superficiales se comportan de modo diferente de los de las capas profundas en términos de síntesis de proteínas matriciales, nivel de expresión de receptores de membrana y respuesta a las citoquinas y FC; por ejemplo los condrocitos de las zonas intermedia y profunda sintetizan más colágeno tipo II y GAG.

A mayor profundidad los condrocitos disminuyen en número, son de mayor tamaño y mayor actividad metabólica. Incluso en una misma zona topográfica los condrocitos pueden variar su ritmo de crecimiento, expresión génica y nivel de biosíntesis específicos, condicionados por el estado de la matriz adyacente y el nivel local de expresión de citoquinas.

Los condrocitos son células esféricas de unas 13 μm de diámetro pero en determinadas zonas pueden adquirir formas más alargadas. Representan entre el 1% y el 12% del volumen del cartílago, el resto es MEC sintetizada por los mismos condrocitos, además de enzimas catalíticos, como metaloproteasas (MMP) y sus inhibidores tisulares (TIMP), FC (TGF- β), NO, citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 IL-10) (Hoberg 2006; Iannone 2010).

En la superficie celular los condrocitos expresan receptores que responden de forma autocrina o paracrina a los diferentes FC y citoquinas, así como receptores TLR, involucrados en la respuesta inmunitaria y reconocimiento de patógenos (Kim 2006). También responden a estímulos intracelulares y extracelulares, que incluyen la concentración de H⁺, concentración de Ca²⁺, volumen, presión y osmolaridad. Se desconoce la importancia relativa de cada uno de estos factores. El Ca²⁺ por ejemplo, condiciona muchas funciones celulares, incluyendo la síntesis y degradación de la matriz.

Los condrocitos también actúan como sensores que responden a estímulos mecánicos. Niveles de estrés mecánico insuficientes o excesivos favorecen los procesos catabólicos, mientras que los niveles fisiológicos normales favorecen los procesos anabólicos. En condiciones normales, responden produciendo componentes de la MEC, como agregano y colágeno tipo II. Sin embargo, una sobresolicitación mecánica altera el metabolismo de los condrocitos e induce la producción de proteasas y mediadores de la inflamación. Estos procesos conducen a una elevación de los niveles de IL-1 y TNF- α que, a su vez, disminuyen la síntesis de colágeno e incrementan las proteasas (incluidas las MMP) y otros mediadores de la inflamación como IL-8, IL-6, IL-17, IL-18, PGE₂ y NO. Este último ejerce múltiples efectos nocivos sobre los condrocitos incluyendo la apoptosis, la inhibición de síntesis de colágeno y PG y activación de la producción de MMP.

Las sollicitaciones mecánicas a las que se ve sometido el cartílago a causa del movimiento articular actúan como estímulos mecánicos, osmótico/iónicos y eléctricos que pueden afectar la homeostasis y provocan cierta deformación puntual y la consecuente reorganización del citoesqueleto que ocasiona la modulación de la actividad anabólica de los condrocitos (Blain 2009). De hecho, el citoesqueleto supone una interfase física entre los condrocitos y la matriz que comunica los estímulos mecánicos y la respuesta biosintética. Cuando los condrocitos se aíslan del tejido y se cultivan en monocapa pierden fácilmente su morfología y su fenotipo queda alterado observándose una pérdida de la capacidad de síntesis de colágeno tipo II. Ciertas citoquinas, IL-1 β es un ejemplo, regulan la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, lo que provoca efectos sobre la síntesis de moléculas de la matriz (Blain 2009).

La Matriz Extracelular (MEC) se compone principalmente de agua, colágeno, proteoglicanos, glucoproteínas (FC, COMP, proteinasas) y en mucha menor cantidad minerales y lípidos. La composición de la MEC varía en función de la profundidad y de la situación respecto a los condrocitos: los PG ricos en queratán-sulfato se acumulan en la MEC interterritorial, rica en colágeno, la que se encuentra entre varios grupos celulares. En la MEC territorial, localizada alrededor de los condrocitos, abundan los PG ricos en condroitín-sulfato y se encuentran escasas fibras de colágeno.

En el cartílago normal existe un recambio permanente y equilibrado entre la síntesis de PG por los condrocitos y la degradación por proteinasas extracelulares, que están influenciadas por citoquinas como la IL-1.

La renovación continua de los componentes de la MEC depende de una serie de proteasas tanto intra como extracelulares. En condiciones normales el cartílago presenta niveles altos de inhibidores de estas proteasas. La alteración de este equilibrio entre inhibidores y enzimas puede ser una de las causas del origen de la artrosis.

El agua es fundamental para la nutrición del cartílago y para la lubricación articular. Permite su deformación en respuesta a las sollicitaciones mecánicas, fluyendo dentro y fuera del mismo. Su cantidad es mayor en superficie (80%) que en profundidad (60%).

En la artrosis el agua aumenta hasta proporciones del 90%, ocasionando un incremento en la permeabilidad y descenso tanto de la resistencia como del módulo de Young del cartílago.

Para la comprensión de los datos que aporta este estudio interesa conocer que, con independencia del agua fuertemente ligada a los PG de predominio en capas profundas del cartílago (14%), existe agua ligada al colágeno (6%) y a las macromoléculas de la matriz o agua libre distribuida principalmente en la zona superficial (80%). Cuanto más estructurado está el cartílago menor proporción de agua libre presenta y mayor ligada a los PG (Reiter 2012).

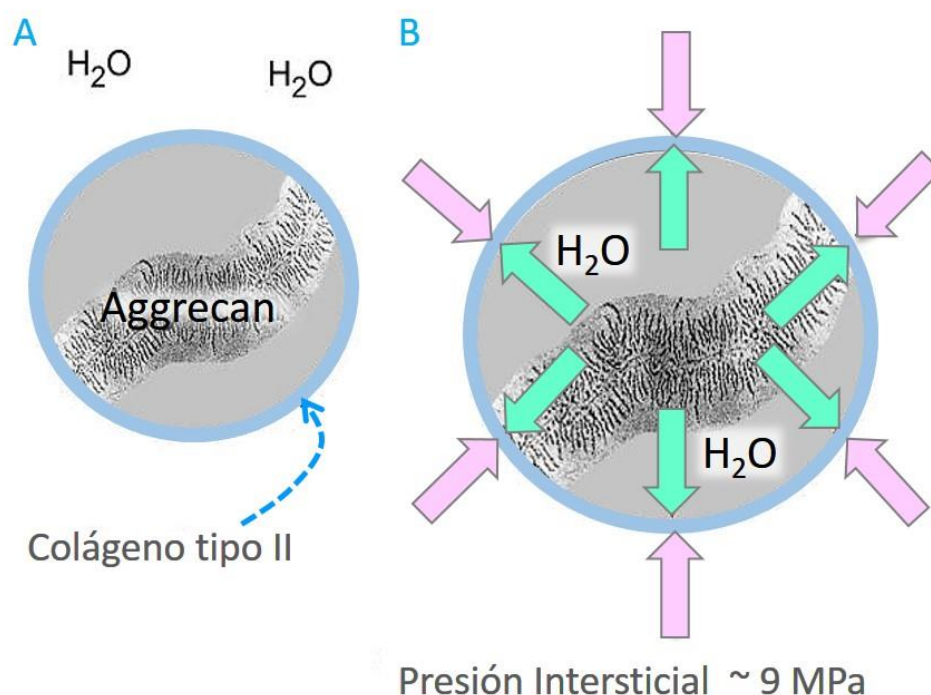


Fig. 4. Interacción de los componentes de la MEC.

Los PG, la red de colágeno y el agua intersticial confieren al cartílago sus propiedades biomecánicas. Los PG fijan el agua, lo que les permite hincharse. La red de colágeno limita la tumefacción e inmoviliza los PG, de manera que el cartílago actúa como un balón resistente a las fuerzas de compresión. La red de colágeno, tensada, es más resistente a las fuerzas de tracción que se producen durante la carga. Los PG y el colágeno se complementan, creando un material compuesto. Cuando una carga mecánica es aplicada sobre el cartílago, la presión en la MEC se incrementa y comienza a fluir líquido intersticial hacia fuera compensando los gradientes de presión del tejido. Tras la descarga, los PG se expanden de nuevo, invirtiendo el gradiente de presión (Bader 1994).

El colágeno supone 2/3 del peso en seco del cartílago articular adulto (Eyre 2002). Es la proteína estructural mayoritaria de la matriz extracelular cartilaginosa. La mayoría del colágeno del cartílago, el 90-95% del total, es del tipo II (Bhosale 2008).

Forma una malla tridimensional que alberga los PG y el ácido hialurónico (HA), elementos que proporcionan resistencia a la compresión. En una proporción mucho menor se encuentra colágeno del tipo VI, IX, X y XI. Recientemente se ha detectado colágeno tipo III colocalizado con colágeno tipo II (Eyre 2006). Se piensa que los condrocitos sintetizan este tipo de colágeno, hasta ahora solo relacionado con el colágeno I, como respuesta al daño de la matriz (Eyre 2002).

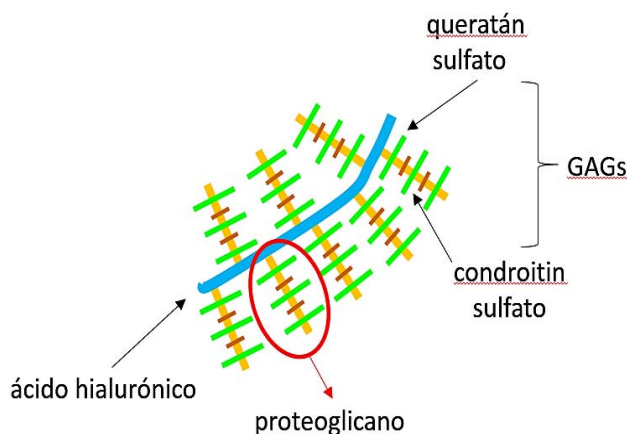


Fig. 5. Estructura del agregado de agregano

Los proteoglicanos (PG) constituyen el 35% de la MEC seca. Constan de un núcleo proteico al que se fijan glucosaminoglicanos (GAG). Son moléculas de alto peso molecular que contienen grupos aniónicos sulfato y carboxilo, confiriendo a la MEC un elevado efecto osmótico porque la densidad de cargas negativas en los PG atrae cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) y repele aniones (Cl^- , HCO_3^-). El movimiento de cationes a la MEC que incrementa la presión osmótica, es seguido por absorción de agua, aumentando la presión hidrostática; finalmente las presiones osmótica e hidrostática se

igualan, deteniéndose el flujo neto de agua hacia la parte concentrada.

Este equilibrio entre PG hidratados y colágeno es fundamental para la resistencia del cartílago a las sobrecargas mecánicas (Buckwalter 2006). Los PG se consideran responsables de la resistencia a la compresión y el colágeno a la tensión y cizallamiento; el agua, al responder a los gradientes de presión, es responsable del comportamiento viscoelástico del cartílago.

El agregano representa el 85% de los grandes PG de la MEC; los tres GAG principales que integran su molécula son el condroitín-4-sulfato, el condroitín-6-sulfato y el keratán sulfato (KS). Las moléculas de agregano se unen al HA formando agregados de agregano.

El biglicano, la decorina y la fibromodulina son pequeños PG que representan el 5% de los PG.

La decorina y la fibromodulina se encuentran asociados a las moléculas de colágeno próximas a la superficie del cartílago articular.

La decorina inhibe la formación de colágeno tipo I y II y la fibromodulina inhibe la fibrilogénesis de colágeno tipo I y III.

El biglicano y la decorina se unen al TGF- β impidiendo que desarrolle su función biológica.

El óxido nítrico (NO) es un catabolito resultante de la oxidación de la L-arginina, catalizada por enzimas liberadas por macrófagos y células endoteliales ante la presencia de endotoxinas y citoquinas (IL-1 y TNF- α).

Se presenta bajo varias formas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) y citoquina-inducible (iNOS); esta última es la más estudiada en patología articular.

Inhibe la síntesis de colágeno II y PG por los condrocitos y estimula la actividad de MMP e interfiere en la expresión de IL-1 por los condrocitos.

Las **citoquinas** son pequeñas proteínas que una vez liberadas por la célula al espacio extracelular afectan al comportamiento de otras células. Se clasifican según sus efectos como catabólicas, moduladoras o anabólicas.

Las citoquinas anabólicas. Incluyen FC como FGF, IGF, PDGF y TGF- β que promueven la proliferación de condrocitos y la producción de colágeno II y PG, la BMP-2 puede estimular la síntesis de PG si la IL-1 no está presente. Son sólo algunos de los efectos conocidos de los FC. Es de gran interés conocer las complejas secuencias en las que intervienen los FC, sus sinergias y las cascadas de señalización celular que originan para poder intervenir adecuadamente en el curso de la enfermedad (Van den Berg 2001; Van Miert 2002; Schmidt 2006).

Las citoquinas catabólicas o proinflamatorias. Incluye la IL-1 y TNF- α , que pueden ser segregadas por los sinoviocitos y los condrocitos. Ejercen su acción uniéndose a los receptores de membrana.

Sus niveles se incrementan en la artrosis, con lo que estimulan la producción de MMP, NO y prostaglandina E2 (PGE₂), a la vez que inhiben la síntesis de agregano y de colágeno tipo II. Además, IL-1 puede inhibir la producción de antagonistas de receptores de IL-1 (IL-1ra) y de inhibidores tisulares de MMP (TIMP). El equilibrio entre las citoquinas es fundamental para mantener la estructura y función articular porque sus efectos no son taxativamente anabólicos o catabólicos. En general la familia TGF- β se asocia a una respuesta anabólica o reparativa y la IL-1 β y TNF- α se asocia a intenso efecto catabólico.

Esta relación antagónica viene condicionada por ser señales que comparten unas mismas rutas bioquímicas a través de la fosforilación de protein-quinasas que conducen a la activación de determinados factores de transcripción. Se supone que en esta relación predomina el efecto neutralizador del TGF- β sobre la IL-1 β y a medida que el individuo avanza en edad se va perdiendo la capacidad de neutralización.

Las citoquinas reguladoras o moduladoras, como IL-4, IL-10 y IL-13, reducen la producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF, MMP y prostaglandinas. A su vez estimulan la síntesis de TIMP y IL-1ra.

La **IL-1ra** se une a los receptores específicos de IL-1, bloqueándolos e impidiendo la acción de IL-1. Existen varias isoformas, las secretadas (sIL-1ra) y las intracelulares (icIL-1ra), producidas por condrocitos, fibroblastos sinoviales, neutrófilos y macrófagos. **Los inhibidores tisulares naturales de las metaloproteinasas (TIMP)** a nivel articular pueden ser sintetizados por diversas células entre las que se incluyen condrocitos y sinoviocitos. Cuando se unen a las MMP actúan formando un complejo inactivo. **Las proteinasas** (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) son metabolitos del ácido araquidónico que están producidos por las células inflamatorias, los condrocitos y los sinoviocitos. Estas sustancias están presentes en las articulaciones inflamadas a consecuencia de las citoquinas catabólicas (IL-1 β y TNF). **PGE₂** participa en el proceso inflamatorio desencadenando vasodilatación, reduciendo el umbral del dolor, estimulando el activador del plasminógeno y la degradación de PG. Por otra parte tiene efectos antiinflamatorios e inhibe la expresión de algunas citoquinas catabólicas (IL-1 y MMP). Se desconoce el balance neto de esta doble actividad. **Los leucotrienos** causan vasodilatación e intervienen en la quimiotaxis.

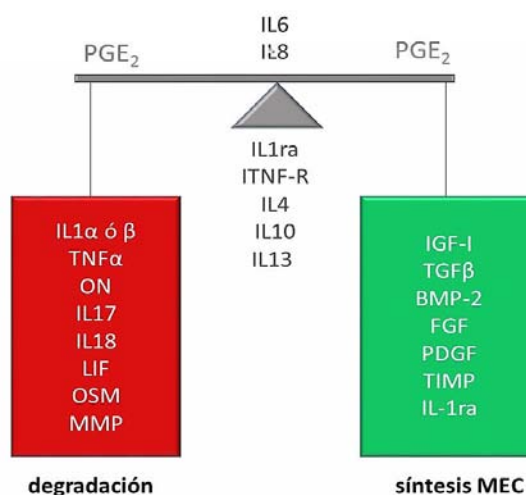


Fig. 6. Mediadores del balance anabólico-catabólico del cartílago

La membrana sinovial es decisiva en el mantenimiento de la homeostasis articular porque permite el intercambio de nutrientes y subproductos metabólicos entre la sangre de los capilares de la membrana y los tejidos articulares. La eficiencia de este intercambio depende de la densidad y buen estado de una amplia red capilar que se prolonga emitiendo una arteriola central a lo largo de las vellosidades. Estas son fundamentales para el intercambio de sustancias y para la producción de ácido hialurónico.

La membrana está formada por dos capas, la subíntima, muy vascularizada e inervada, constituida por tejidos fibroso y graso y la íntima con un espesor equivalente al de 1 a 5 estratos de células, sinoviocitos A responsables de la fagocitosis de partículas no deseadas y sinoviocitos B que segregan proteínas, principalmente segregan hialurónico, colágeno, lubricina, prometalo-proteinasas de la matriz (pro-MMP), interleukinas y eicosanoides (PGE₂).

La secreción de proteínas se enmarca dentro del equilibrio anabólico-catabólico de la articulación sana. Su desequilibrio puede inducir el desarrollo de la enfermedad articular.

La membrana sinovial es el tejido con más capacidad de reacción inflamatoria expresada con cambios hipertróficos e hiperplasia vascular, acompañados de infiltración leucocitaria. La membrana inflamada puede liberar proteinasas y citoquinas que pueden acelerar la destrucción de cartílago o de hueso. Cerrando el ciclo, los propios productos de degradación del cartílago provocan la liberación de más colagenasas y otras enzimas hidrolíticas por la sinovial.

Esta cascada bioquímica desencadena la liberación de IL-1 β y TNF- α que incrementan la espiral inflamatoria. La artrosis erosiva representa un estadio más avanzado con mayores niveles de proteinasas y citoquinas.

La inflamación sinovial puede estar presente en todas las fases de la enfermedad y extenderse al conjunto de la articulación, incluso en las formas que presentan estudios radiográficos normales (Chevalier 1998; Richette 2005).

El ácido hialurónico (HA) es un elemento fundamental del **líquido sinovial** que actúa como lubricante de las superficies articulares y contribuye a regular la composición química del medio, excluyendo de su composición a otras proteínas y leucocitos; este efecto excluyente tendría lugar a nivel de la membrana sinovial. La concentración y el peso molecular del HA son decisivos y repercuten en estas funciones.

El HA está claramente relacionado con la nocicepción; disminuye los impulsos nerviosos evocados por el movimiento de las articulaciones inflamadas y también disminuye la sensibilidad nerviosa de los canales de iones.

Tiene efectos antioxidantes y puede actuar como antiinflamatorio. Suprime la producción de TNF- α e inhibe la expresión de IL-1 β y estromelisina (MMP-3) y estimula la síntesis de TIMP-1. Atenúa la síntesis de PGE₂ por parte de los sinoviocitos y condrocitos. Reduce los niveles de ácido araquidónico, algunos leucotrienos y la producción de PGE₂ inducida por IL-1 α .

Regula la migración de linfocitos y polimorfonucleares inducida por el leucotrieno B₄, así como la fagocitosis, la degranulación y la perjudicial adhesión de los neutrófilos al cartílago.

Puede tener efectos directos o indirectos sobre la sustancia P, inhibiendo la permeabilidad vascular que se ve incrementada por esta.

La fragmentación del HA en el líquido sinovial estimula la expresión de MMP y receptores CD44. Por tanto, la despolimerización del HA del líquido sinovial que ocurre en la artrosis puede contribuir al incremento de enzimas degradantes y da sentido a la utilización clínica del HA exógeno, ya que éste estimula la producción de HA endógeno.

Muchos de los efectos del HA evaluados in vitro dependen de la concentración y peso molecular (PM) del mismo. Se ha sugerido que los efectos de los preparados de HA con un PM superior a 1×10^6 Da son clínicamente mejores. Los estudios in vitro que analizan los efectos del HA sobre los condrocitos y algunos estudios clínicos también parecen corroborar esta opinión; sin embargo, es posible que cuando se desea un efecto más allá de la superficie cartilaginosa, tal es el caso del hueso subcondral, ligamentos o meniscos, los preparados de bajo peso molecular sean más apropiados porque difunden mejor.

Otra parte de la composición del líquido sinovial procede del plasma, microfiltrado a nivel del endotelio de la capa subíntima permitiendo el paso de moléculas de un tamaño no superior a 10 kDa (glucosa, oxígeno, CO_2 , proteínas, etc).

En condiciones normales, el líquido sinovial presenta una celularidad baja, se admiten hasta 500 células por microdecilitro.

El hueso subcondral proporciona un soporte estable al cartílago articular. Se estructura como hueso cortical con canales haversianos dispuestos paralelamente a la superficie articular que expanden la irrigación hasta el cartílago calcificado. Es más deformable que la cortical diafisaria y experimenta remodelaciones como respuesta al ejercicio.

Aún no está claro si las citoquinas del hueso subcondral son las que activan el proceso de la artrosis o bien representan una respuesta a una sobresolicitud mecánica, a sustancias originadas en el cartílago o la membrana sinovial pero se acepta que la alteración de las funciones de reabsorción y remodelación de los osteoblastos y osteoclastos pueden desequilibrarse y participar e incluso intervenir como causa primaria en el desarrollo de la artrosis.

IGF-1 y **TGF- β** se encuentran incrementados en las zonas con osteofitos. Estos factores de crecimiento contribuyen a su formación y a la remodelación ósea.

El VEGF estimula la angiogénesis en el hueso subcondral siendo este proceso independiente del estímulo sobre la vascularización en la membrana sinovial.

El óxido nítrico (NO) también está relacionado con las funciones de la célula ósea

La isoforma endotelial ecNOS se expresa en el hueso e interviene en la regulación de la actividad osteoblástica y formadora de hueso bajo la influencia de las cargas mecánicas. Actúa junto con las prostaglandinas estimulando la formación de hueso e inhibiendo la resorción ósea.

La isoforma iNOS es la más estudiada en patología articular. Estimula la actividad de MMPs e interfiere en la expresión de IL-1ra por los condrocitos.

La síntesis de colágeno II y proteoglicanos por los condrocitos se inhiben si se crea las condiciones bajo las cuales se incrementa la producción de iNOS.

Por otra parte **IL-1** y **TNF** inducen iNOS en las células óseas, lo que potencia una pérdida de hueso.

Los ligamentos y cápsula periarticular proporcionan estabilidad a la articulación.

La inervación acompaña a la estructura vascular de estos tejidos.

Su metabolismo está influenciado por la actividad, de tal manera que el ejercicio los hipertrofia y la inactividad los atrofia. Dependiendo del tipo y rango de movimiento, los ligamentos y la cápsula se relajan y tensan en determinadas posiciones de flexión y extensión. Esta adaptación puede reducirse si hay un exceso de deposición de tejido fibroso.

1.3. ARTROSIS

Como puede entreverse en la lectura de los apartados anteriores, el factor concreto que desencadena esta patología es de difícil identificación. Sin renunciar a desencadenantes mecánicos como la sobrecarga ponderal o la desalineación de la extremidad, argumentada y afrontada clásica y especialmente en el ámbito de la cirugía ortopédica, se acepta que la degradación del cartílago deriva de la interacción de una gran variedad de factores que llevan a alterar el fenotipo de los condrocitos, la síntesis de moléculas que impiden la correcta estructuración de la MEC y el aumento de enzimas catabólicas que desequilibran la balanza entre síntesis y catabolismo en beneficio de la segunda.

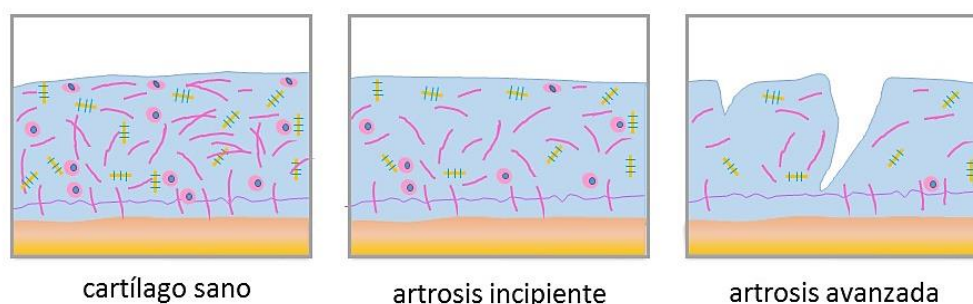


Fig. 7. Pérdida de celularidad, PG y colágeno en el proceso evolutivo de la artrosis

Muchos argumentos sugieren la extensión de la enfermedad en «manto», a partir de una lesión focal. El cartílago adyacente a las lesiones focales artrósicas no es normal, en él se observa una aceleración del *turnover* de los colágenos con aumento de expresión de colagenasas y aumento de la expresión de muchos genes de síntesis (Wu 2002).

Los mecanismos de reparación intrínsecos son muy limitados debido a la dificultad de los condrocitos para multiplicarse y reparar las lesiones.

El término «*matrix flow*» describe la propagación de condrocitos y matriz cartilaginosa desde la periferia de la lesión hacia el centro de la misma en un intento de rellenar el defecto. Se acepta que el éxito de su efecto reparador depende de la superficie y espesor afectados y en cualquier caso la reparación se efectúa por medio de tejido fibrocartilaginoso cuyas propiedades funcionales y características histológicas son de inferior calidad que las del tejido original.

Los mecanismos extrínsecos se basan en la aportación de células y otros factores no procedentes del cartílago, sino del hueso subcondral. El intento de emular este mecanismo natural es lo que justifica la perforación del hueso subcondral o microfractura quirúrgica (*micropicking*) con intención de procurar la llegada de células indiferenciadas y factores de crecimiento que estimulen la reparación.

El progresivo conocimiento de estos aspectos, digamos biomoleculares, incentiva el apuntar a nuevas dianas terapéuticas que pueden abordarse de forma aislada, sin perjuicio de asociarse a otros procedimientos quirúrgicos como son las osteotomías de realineación u otras actuaciones quirúrgicas clásicas.

Este estudio se ha desarrollado en este ámbito conceptual pero abordando el problema desde una óptica exclusivamente biológica, entendiendo que sea cual sea la causa, cuando se desencadenan los procesos degradativos, se liberan residuos de componentes de la MEC y partículas de desecho que promueven una reacción inflamatoria de la membrana sinovial con

importante infiltración de linfocitos T y monocitos, lo que supone una cronificación y entrada en el bucle inflamación/degradación.

El papel de células inmunitarias en el desarrollo de artrosis es reconocido (De Lange-Brokaar 2012). En el líquido sinovial de articulaciones artrósicas también se han encontrado exosomas derivados de células CD4+, CD19+ y CD14+. Son pequeñas partículas, de entre 30 y 100 nm, liberadas por las células a través de la membrana citoplasmática. Contienen proteínas, RMN mensajero y micro RNAs que juegan un papel mediador en la intercomunicación celular. Los exosomas de fibroblastos sinoviales activados inducen cambios artrósicos en condrocitos articulares (Kato 2014).

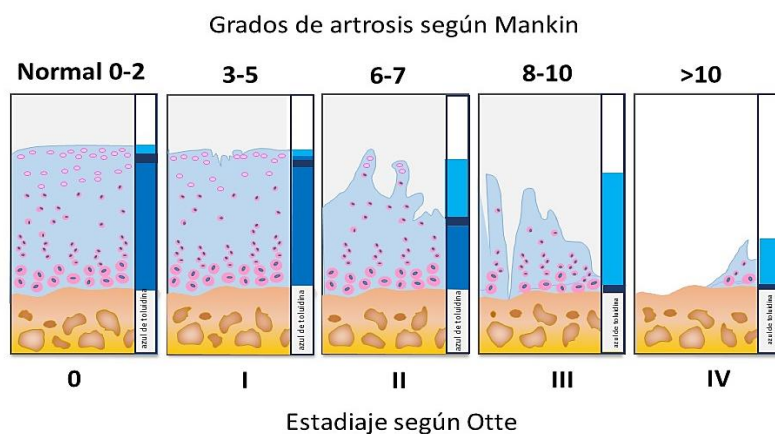


Fig. 8. Clasificación de la artrosis según Mankin comparativa con el Estadaje según Otte

En los inicios del proceso degenerativo, los condrocitos proliferan y se incrementa la síntesis de la MEC por una acción conjunta de FC de forma parecida a la respuesta reparativa que ocurre en las lesiones subcondrales. Pero a la vez que ocurre esta respuesta proliferativa celular se observa una degradación de la matriz porque los nuevos PG tienen una composición anormal. La red de colágeno se rompe permitiendo a los PG retener mayor cantidad de agua de lo que resulta el edema del cartílago que se describe en la fase I de la artrosis.

En la artrosis avanzada la presencia de PG disminuye y se produce un descenso del contenido de agua y por tanto la pérdida de las propiedades biomecánicas fundamentales del cartílago que le confieren elasticidad y resistencia a la compresión. Se evidencia la necrosis de los condrocitos y se incrementa la actividad catabólica deteniéndose la síntesis de MEC. El colágeno tiende a la desorganización y desintegración. Los condrocitos son entonces sometidos a mayor estrés mecánico cerrándose el círculo vicioso y acelerándose el proceso de degradación.

En el cartílago artrósico se observa un incremento significativo de condrocitos apoptóticos en relación con el cartílago no artrósico.

La existencia de células apoptóticas impide el mantenimiento, la integridad y la homeostasis y de ello deriva el deterioro del cartílago (Borrelli 2006). En la articulación artrósica se detectan pues cantidad de citoquinas proinflamatorias características de la artrosis (IL-1, TNF, IL-6, IL-8, IL-17) que participan directamente de la erosión/degradación del cartílago y a su vez activan la síntesis de otras citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-17, IL-8...) y de enzimas catabólicos (MMP) que inhiben la síntesis de colágeno tipo II y PG.

Otras citoquinas y moléculas, como ON, PGE₂ y una gran variedad de enzimas degradativos participan en este proceso que la terapia regenerativa intenta controlar y si es posible revertir aportando al foco artrósico elementos de origen biológico con suficiente potencial antiinflamatorio y anabolizante (Fernandes 2002; Goldring 2004; Buckwalter 2006; Aigner 2007).

1.3.1. Manifestaciones clínicas

1.3.1.1. Dolor

El cartílago articular no está inervado y no puede generar dolor por sí mismo; el dolor deriva básicamente de alteraciones de la cápsula articular o del hueso subcondral que son ricos en fibras nerviosas (Dieppe 1995). Por otra parte las técnicas de imagen utilizadas en el diagnóstico, especialmente la radiográfica, no definen con precisión el grado de alteración alcanzado. No existe pues correlación entre el dolor y el grado de artrosis.

Fibras nociceptoras mielínicas y amielínicas detectan los estímulos que dañan la integridad corporal. Las primeras son responsables del dolor agudo, las fibras amielínicas son responsables del dolor más persistente.

El dolor de la rodilla aparece al levantarse de una silla, subir y bajar escaleras, caminar por terreno irregular, arrodillarse o ponerse en cuclillas. Ocasionalmente pueden presentarse episodios inflamatorios, de mayor o menor duración, con derrame articular que provocan mayor dolor e impotencia funcional, en ocasiones los síntomas son muy dispares en relación a la severidad de los cambios estructurales.

La artrosis puede afectar el cartílago de todos los compartimentos de la rodilla; femorotibial medial, lateral y patelofemoral, a dos o sólo a uno de dichos compartimentos. En cualquier caso la artrosis debe contemplarse como una enfermedad que afecta a la globalidad de la articulación. La afectación del componente femoropatelar es más frecuente en mujeres menores de 40 años y suele ser bilateral y simétrica. Cuando da síntomas es característico el dolor en la región anterior de la rodilla que se desencadena al extender la rodilla o al subir y bajar escaleras.

La afectación femorotibial suele ser al principio unilateral pero con la evolución de la enfermedad pueden afectarse ambas rodillas.

Al producirse el deterioro estructural que el organismo interpreta como agresión, las células del sistema inmunológico y las células lesionadas liberan localmente sustancias sensibilizadoras de los nociceptores, como histamina, iones potasio, serotonina y PGE₂. Como consecuencia de estos estímulos, las terminaciones sensoriales liberan neuropéptidos.

La sustancia P liberada actúa a través receptores de células endoteliales de los capilares y estimulando la liberación de histamina por parte de las células plasmáticas, contribuyendo así a la extravasación de plasma y provoca una intensa y duradera vasodilatación. Niveles elevados de sustancia P pueden estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias, IL-1 y TNF, por parte de los monocitos. Pero esta secuencia también puede ser descrita de forma inversa, cerrando un círculo vicioso, ya que TNF- α , IL-1 β y IL-8 inducen la liberación de sustancias sensibilizadoras de los nociceptores.

La cadena de acontecimientos puede perpetuar un ciclo de «inflamación neurogénica», que ha de entenderse como que la respuesta inflamatoria es modulada en parte por una comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema inmune. Esto incluye la puesta en marcha de mecanismos hormonales y neuronales por medio de los cuales el cerebro regula la función del sistema inmunitario y, en sentido contrario, las citoquinas permiten que el sistema inmune regule el cerebro. Un ejemplo de esta relación es que la simpatectomía articular se asocia a una disminución de la inflamación.

Actualmente, una parte de la investigación que se desarrolla en este ámbito con finalidad terapéutica está dirigida a interceptar estas secuencias y determinar puntos de bloqueo y antagonistas de factores nocivos.

1.3.1.2. Derrame sinovial

Revela un desequilibrio entre la producción, es decir la circulación sanguínea, y la evacuación, es decir la circulación linfática pero el grado de efusión sinovial no está siempre correlacionado con la gravedad de la artrosis. Pueden producirse derrames de repetición, refractarios a los tratamientos habituales sin que obligatoriamente exista una afectación avanzada del cartílago hialino articular.

Aunque la artrosis suele ir acompañada de cambios en la viscosidad del líquido sinovial debido a una disminución de la concentración de ácido hialurónico y/o degradación molecular del mismo, el contenido en proteínas y la citología del líquido sinovial tampoco reflejan siempre la afectación real de la articulación.

El estudio de biomarcadores de síntesis y degradación, así como de los cristales, presentes en el líquido sinovial, abre un camino para la detección precoz, la valoración de la situación real de la articulación y eficacia de los tratamientos.

La circulación sanguínea a nivel de la membrana sinovial y por tanto la normal producción de líquido sinovial puede verse afectada por la presión intrarticular (PIA), la temperatura local, la movilidad articular, reflejos, tono vasomotor y la liberación local de mediadores vasoactivos.

La presión intrarticular (PIA), que normalmente tiene unos valores inferiores a la presión atmosférica, ejerce gran influencia sobre la circulación sanguínea articular, porque la presión a nivel de los capilares de la membrana sinovial es muy baja y estos se pueden colapsar fácilmente si se incrementa la PIA.

En una rodilla normal la PIA es de -40 a 100 mm Hg en relación a la presión atmosférica durante la marcha. El derrame o la efusión sinovial elevan la PIA.

Si estas alteraciones no se resuelven, la reducción de la circulación sanguínea derivará en otras consecuencias nocivas tales como hipoxia crónica, fibrosis e hipertrofia sinoviales, progresiva disminución de la red capilar de la membrana sinovial, acidosis local, disminución de la capacidad de eliminación de catabolitos, incremento de la producción de determinados mediadores de la inflamación y dificultades para la difusión de medicamentos administrados sistémicamente.

La práctica habitual de ejercicio se considera un aspecto muy importante para el mantenimiento de la circulación articular correcta y de la PIA en valores adecuados porque incrementa el flujo sanguíneo y también el drenaje linfático.

Sin embargo, a medida que progresa la fibrosis y, por tanto, disminuye la movilidad articular, el efecto beneficioso del ejercicio se manifiesta en menor medida y en aquellos casos en que la fibrosis va acompañada de una sustancial reducción de la red vascular, puede incluso resultar un factor desfavorable e incrementar la hipoxia local.

1.3.2. Procedimientos diagnósticos

El diagnóstico de la artrosis sigue basándose en la anamnesis y en la exploración clínica. Durante la anamnesis, se evalúan las características del dolor –características mecánicas o inflamatorias– la limitación funcional y la respuesta al tratamiento cualquiera que sea.

Mediante la exploración física, se evalúa la presencia de derrame articular, el grado de movilidad pasiva y activa, el grado de deformidad local y los ejes de las extremidades.

Las exploraciones de imagen y otras pruebas complementarias permiten asegurar y precisar este diagnóstico y establecer un pronóstico evolutivo de la enfermedad, orientar la estrategia terapéutica que se considera más adecuada al caso y evaluar el resultado de los tratamientos.

1.3.2.1. Radiografía

El estudio radiográfico complementa la exploración inicial. Clásicamente los criterios clasificatorios, utilizados comúnmente como diagnósticos, se han basado en la radiografía simple. La clasificación de Kellgren y Lawrence (K-L) descrita en 1957 ha sido la más utilizada (Kellgren 1957). En nuestro caso sólo se emplea a efectos diagnósticos y clasificación previa pero no como un elemento de evaluación de la respuesta terapéutica.

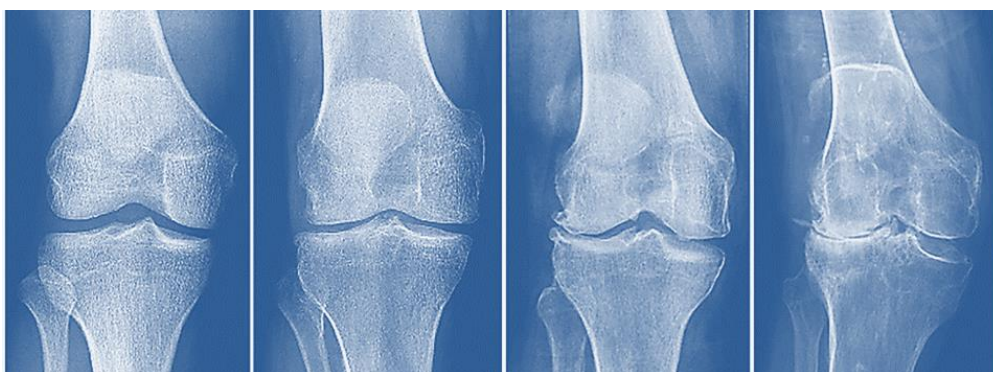


Fig. 9. Escala radiológica de Kellgren-Lawrence (Tomada de Chevalier. EMC 14-003-C-109)

- | | |
|------------|--|
| 0 | Ningún signo de artrosis. |
| I | Dudosa. Osteofito mínimo de dudoso significado. |
| II | Mínima. Osteofito definido. |
| III | Moderada. Disminución del espacio articular. |
| IV | Severa. Gran disminución del espacio articular. Esclerosis subcondral. |

La clasificación de K-L valora la presencia de osteofitos, esclerosis subcondral, la disminución del espacio articular y las geodas e irregularidades corticales, omitiendo la evaluación del adelgazamiento del cartílago, signo etiopatogénico importante y sensible.

Aunque el adelgazamiento de la interlínea articular se utiliza como criterio de valoración primario para evaluar el estado del cartílago y la medición de la interlínea articular se ha intentado estandarizar mediante radiografía simple, la medición no es ni mucho menos exacta teniendo en cuenta que puede existir derrame articular, variación del espacio por la carga y otras circunstancias que distorsionen la medición.

En definitiva la evaluación radiográfica de la interlínea se ha mostrado imprecisa en estudios longitudinales (Hayashi 2011).

Es ampliamente conocida la disparidad clínico-radiológica de la artrosis, en virtud de la cual, pacientes con síntomas típicos apenas tienen alteraciones en la radiografía simple. Por otro lado, en la artrosis pre radiográfica ya existe deterioro del cartílago y modificaciones del hueso subcondral, pero la sensibilidad de la técnica no permite visualizarlos (Kijowski 2006).

Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, consideramos que la radiografía simple sigue siendo un instrumento válido y la base de todos los criterios diagnósticos de artrosis.

El hallazgo radiográfico más característico de artrosis es el osteofito. Su patogenia no está clara, pero se ha postulado que la proliferación ósea es la respuesta a una proliferación de vasos sanguíneos que se dirigen a reparar el cartílago degenerado. También se han relacionado con la redistribución de las cargas biomecánicas o como reparación de microfracturas de estrés de

hueso marginal articular. La teoría más aceptada es que su etiopatogenia es multifactorial; el estrés biomecánico local, FC y citoquinas que estimulan la proliferación ósea.

La esclerosis subcondral aparece en las áreas de sobrepresión articular mientras que las geodas subcondrales se deben a áreas de microfracturas de la esponjosa del hueso subcondral y a la entrada de líquido sinovial bombeado durante la movilización de la articulación. Suelen estar rodeadas por un área esclerosa.

1.3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La radiografía simple no detecta cambios precoces de la artrosis. Antes que la reducción de la interlínea pueda ser detectada, el cartílago ya ha reducido su volumen un 11-13% (Raynauld 2008).

Las ventajas de la RMN convencional respecto a la RX para evaluar los cambios morfológicos del cartílago han sido bien establecidas en diferentes estudios (Jones 2004, Raynauld 2008, Conaghan 2011). Puede visualizar alteraciones morfológicas como reducción del volumen del cartílago, irregularidades del contorno, fisuras y adelgazamiento, sobre todo utilizando tecnología de alta resolución como es la RMN 3T. Sin embargo se acepta que sigue presentando limitaciones y no parece ser un marcador preciso ni para el diagnóstico ni para el seguimiento de la artrosis (Hunter 2010). El tamaño de los huesos, muy variable entre individuos, el sexo, la edad y el peso incluso tras el ajuste del IMC, pueden enmascarar una reducción en el volumen del cartílago, si es el único parámetro que se evalúa (Eckstein 2007).

Se han desarrollado técnicas para mejorar la imagen de la RMN convencional para la evaluación específica de la morfología del cartílago como son «SPGR», «GRE» y «3D-SPGR» pero estas no proporcionan un contraste fiable entre el cartílago y el fluido y requieren tiempos de adquisición muy largos dificultando su aplicación digamos habitual.

En este intento evaluador morfológico del cartílago han surgido nuevas técnicas como «*Dual-Echo Steady-State (DESS)*», «*Driven Equilibrium Fourier Transform (DEFT)*» o «*Balanced Steady-State Free Precession (SSFP)*» con supresión grasa, que han mejorado el contraste, la resolución y han reducido el tiempo de adquisición aunque siguen sin detectar cambios precoces de la artrosis ni cambios en la matriz extracelular del cartílago (Gold 2009; Trattnig 2011). En este sentido la aparición de la llamada «RMN bioquímica» sobre la que trataremos sí permite una visión detallada de la composición del cartílago y muestra suficiente sensibilidad para registrar variaciones en el sentido degenerativo o regenerativo.

Ambas técnicas de RMN, convencional y bioquímica, combinadas con la evaluación clínica, seguramente representarán en el futuro el abordaje de referencia para establecer el diagnóstico y seguimiento de rutina tras tratamientos con intención regenerativa del cartílago. De aquí el interés por las técnicas que se describen a continuación que se utilizan para visualizar y determinar las características de manera no invasiva de la ultra-estructura del cartílago a modo de biopsia virtual (Welsch 2011, Mosher 2011, Trattnig 2011).

1.3.2.2.1. Biomarcadores

Biomarcador es una característica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos o de respuesta a un tratamiento, siendo susceptible de ser utilizados como variables primarias de resultados y efectividad de ensayos clínicos (Katz 2004). Según sea para diagnóstico, estadiaje y monitorización de una enfermedad y para determinar la respuesta al tratamiento pueden usarse diferentes tipos de biomarcadores. (Aronson 2005; Bauer 2006).

En la articulación sana existe un equilibrio anabólico/catabólico. La alteración de este equilibrio, asociada a la patología articular, hace que fragmentos o metabolitos de determinadas sustancias originales y moléculas que tienen un rol en los procesos metabólicos como citoquinas, proteasas y enzimas inhibitoras, estén presentes en cantidades anormales indicando que están inhibidos o sobreactivados procesos de síntesis o degradación (Fuller 2001; Rousseau 2012).

Estos indicadores, determinados mediante técnicas bioquímicas o inmunológicas, se pueden encontrar en el líquido sinovial si proceden del cartílago, menisco, ligamentos o membrana sinovial y también en el torrente circulatorio (suero) y orina si proceden del hueso subcondral o se incorporan desde el líquido sinovial.

Los biomarcadores pueden ser indicadores de síntesis o degradación y referirse al metabolismo del hueso, cartílago, y la membrana sinovial.

Pueden clasificarse en directos (sustancias originales y fragmentos o productos de degradación del colágeno tipo I, II o PG) o indirectos (sustancias que intervienen en el metabolismo o integridad de estos tejidos: enzimas proteolíticas y sus inhibidores, FC y citoquinas catabólicas) (McIlwraith 2011; Rousseau 2012).

La interpretación clínica de los resultados ha de ser cuidadosa ya que la especificidad de tejido, la velocidad de metabolización y eliminación, las variaciones circadianas, la edad, el ejercicio y otros factores que afectan a los niveles de los biomarcadores se desconocen en buena parte (Frisbie 2008; Van Weeren 2008).

Si no se especifica claramente qué es lo que detecta una determinada técnica analítica, se puede crear cierta confusión a la hora de interpretar algunos resultados. Así por ejemplo, no es lo mismo detectar la Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) íntegra que fragmentos de la misma ya que una elevación o disminución de los valores puede indicar un proceso patológico o todo lo contrario (Taylor 2006).

1.3.2.2.2. Biomarcadores de Imagen

Han sido definidos como cualquier parámetro anatómico, fisiológico, bioquímico o molecular detectable a través de un método de imagen que ayude a establecer la presencia y/o la severidad de una enfermedad determinada (Smith 2003).

Las limitaciones de las herramientas actuales para el control de la artrosis han sido el detonante para identificar biomarcadores específicos que reflejen cambios cuantitativos de la remodelación articular. Las investigaciones se centran en los componentes estructurales de la matriz extracelular, especialmente los marcadores de degradación del colágeno tipo II (Rousseau 2012). Existen diferentes técnicas de imagen para evaluar la red de colágeno y el contenido en PG de la matriz que pueden ser utilizadas en combinación, tanto en contextos clínicos como de investigación, para mejorar la caracterización de los cambios que se vayan produciendo en el cartílago tras tratamientos potencialmente modificadores de su estructura (Hunter 2011, Trattnig 2011). Destacamos las siguientes:

«**Delayed Gadolinium-Enhanced MR Imaging of Cartilage (dGEMRIC)**», cuantifica el contenido de GAG del cartílago en reparación. Los PG y sus subunidades, los GAG, disminuyen en el cartílago artrósico y este método permite evaluar su concentración en el cartílago articular, basándose en su carga negativa.

Consiste en inyectar por vía intravenosa gadolinio iónico con carga negativa 90 minutos antes de realizar la exploración de RMN y efectuar ejercicio para facilitar el paso de contraste a hacia el líquido sinovial. Si existe una cantidad normal de PG (carga -), el contraste (carga -) será repelido. Si la cantidad de GAG es inferior a la normal, el contraste penetra por difusión en el cartílago. Esta mayor captación en las zonas alteradas puede representarse en mapas de color (Gray 2008).

Esta técnica aporta imágenes de alta resolución y sensibilidad, pero como inconvenientes necesita tiempos de adquisición prolongados y comporta la administración de agente de contraste con el consecuente riesgo de fibrosis renal.

«**Diffusion-Weighted Imaging (DWI/DTI)**», captura la media de difusión de las moléculas de agua, reflejando la estructura del tejido a escalas mucho más pequeñas que la que proporciona la resolución de las imágenes.

En líquidos y gases las moléculas fluyen en un movimiento aleatorio constante. Una gota de tinta azul en un contenedor de agua acabará tiñendo el agua por completo, este fenómeno es llamado proceso de difusión. Pero en los tejidos la difusión no es libre, está condicionada por las membranas que restringen el movimiento de las moléculas. Esa misma gota de tinta en el interior de un capilar acabará dibujando el contorno de la pared. Porque el proceso de difusión entre membranas adquiere un patrón anisotrópico, que refleja la geometría del tejido en estudio. La adquisición de imágenes DWI/DTI del cartílago in vivo representa un reto debido a su morfología y la alta resolución que requiere el cartílago (0.5-0.7 mm en plano).

«**Sodium Imaging ($^{23}\text{NaRMN}$)**», siguiendo un procedimiento parecido al dGEMRIC es una técnica muy específica para detectar cambios en el contenido en PG sin requerir agente de contraste pero requiere bobinas especiales y tiempos de adquisición prolongados. Sería útil para detectar cambios tempranos ya que la depleción de PG deriva pérdida de iones Na.

«**T1 ρ** », es sensible a la depleción de PG pero requiere una gran potencia del pulso de RF. Su aplicación queda limitada a la investigación.

«**T2 mapping**», es la técnica aplicada en este estudio, se considera fácil de realizar y sensible a los cambios en el contenido y orientación del colágeno y al contenido de agua aunque es menos sensible a cambios tempranos que suceden en la artrosis como es la depleción de PG.

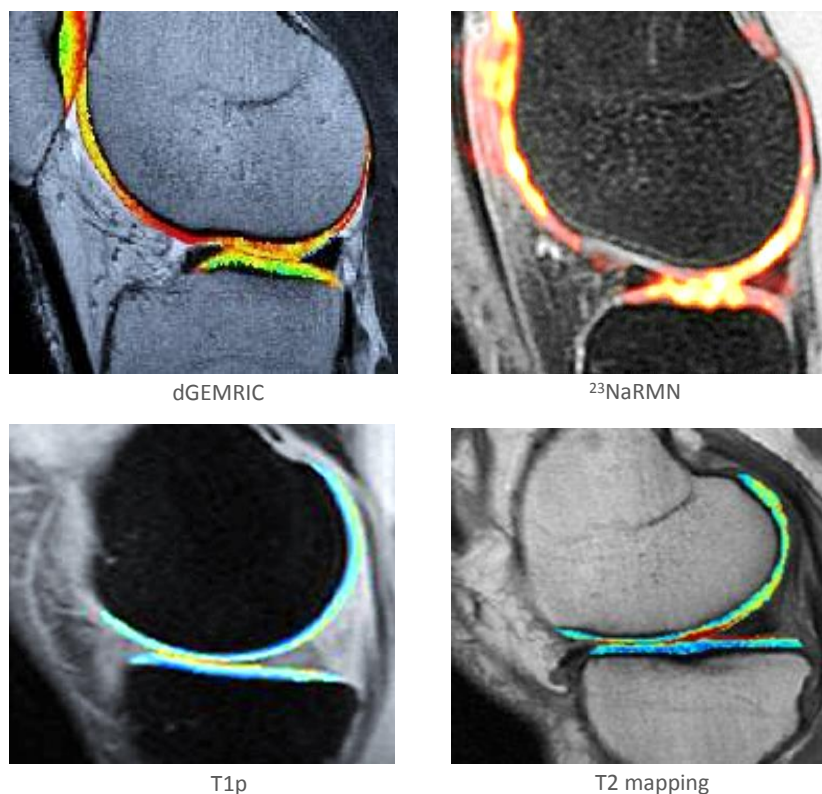


Fig. 10. Imágenes obtenidas con los distintos biomarcadores de imagen.

1.3.2.2.3. Concepto de «tiempo de relajación T2» y «T2 mapping»

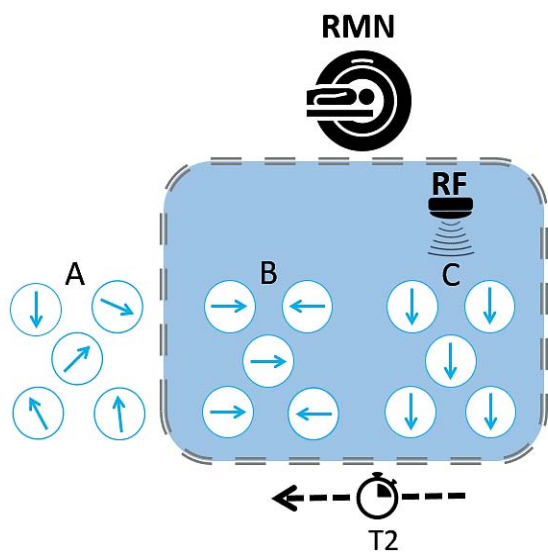


Fig. 11. Concepto del tiempo de relajación T2

Los protones del átomo de hidrógeno se comportan como un imán. Como los electrones, describen un movimiento de rotación sobre su eje (spín) generando un campo magnético alrededor de cada núcleo. Se distribuyen en el espacio rotando sobre su eje, rotación conocida como «spin», con una orientación aleatoria, en equilibrio dinámico, anulándose las fuerzas entre sí «Fig.11 A».

Al someterse al campo magnético de la RMN los protones de hidrógeno se magnetizan temporalmente y se inclinan todos en la misma dirección, se alinean con el campo magnético, pero todavía mantienen la rotación aleatoria sobre su eje «Fig. 11 B».

La suma de vectores de los átomos de hidrógeno se denomina «magnetización longitudinal» o «T1». Manteniendo un campo magnético constante, se aplica un

breve pulso de radiofrecuencia (RF), cambiando la magnetización longitudinal a magnetización transversa o T2 «Fig. 11 C». Al cesar el pulso de RF se produce un cambio al estado previo «B», en un proceso denominado relajación. El tiempo transcurrido entre el estado «C» y «B» es el tiempo de relajación T2.

En el cartílago las moléculas de agua tienen un margen de movimiento muy restringido, impuesto por la estructura macromolecular de la matriz extracelular y los tiempos de relajación T2 son cortos (Burstein 2009).

Cuando se produce una ruptura de la matriz del cartílago, disrupción del colágeno como sucede en la artrosis, aumenta la movilidad del agua y secundariamente se incrementa el tiempo de relajación T2 proporcionalmente al grado de desestructuración.

Así pues cambios en la estructura de la red de colágeno y el contenido de agua, tanto del cartílago sano como del cartílago deteriorado, pueden detectarse mediante la determinación de los valores T2 (Li 2009, Wiener 2010, Trattnig 2011, Surowiec 2014).

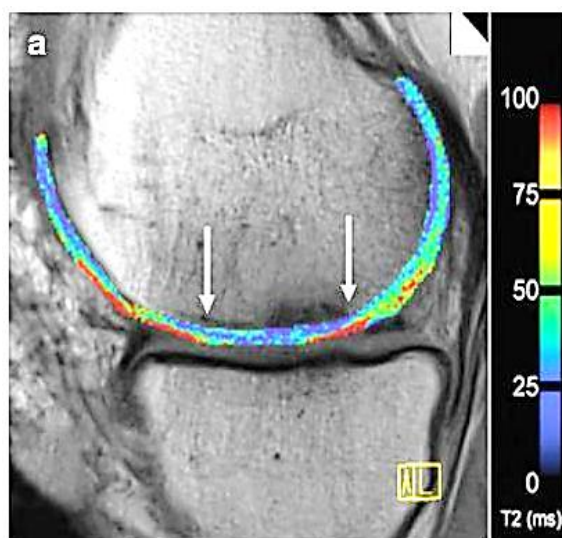
Se ha sugerido que el 60% de la variación T2 se debe a la orientación y organización de las fibras de colágeno, el resto sería atribuible a la interacción del agua con la matriz extracelular y otras macromoléculas (Nissi 2006; Apprich 2010).

Aunque la relación de los valores T2 con la estructura de colágeno está bien establecida, nuevas evidencias indican que también es sensible al contenido en PG, sugiriendo que la carga negativa de los GAG influye en la interacción de los protones de agua (Keenan 2011; Wong 2013).

Así pues cambios sutiles en la hidratación y la organización del colágeno que son indicadores del deterioro del cartílago e indicadores de cambios tempranos de artrosis, pueden visualizarse mediante un mapa de los valores T2 antes de que pueda ser detectada por procedimientos considerados estándar como son los estudios radiográficos (Gold 2009; Taylor 2009; Welsch 2009).

Tanto estudios en modelo animal como ensayos clínicos humanos correlacionan el incremento de los valores T2 con los grados de artrosis, validándolo como un marcador de la estructura de cartílago hialino para el seguimiento de procedimientos de reparación del cartílago articular (David-Vaudey 2004; Dunn 2004; Nissi 2004; Spandonis 2004; Watrin-Pinzano 2004; Eckstein 2007; Burstein 2009, Welsch 2009; Stehling 2010, Xia 2013).

Cuando los valores T2 se sitúan bajo rango de normalidad diversos autores han demostrado que se corresponden con fibrocartílago (Salzmann 2009; Welsch 2009; Oneto 2010; Crema 2011; Nieminen 2012; Baum 2012; Trattnig 2015).



La arquitectura del fibrocartílago traduce en cierto modo la desorganización de las fibras de colágeno que conlleva una disminución del T2 global (Goetz 2008) y modifica la variación zonal de los valores T2. Al evaluar la zona de unión entre cartílago trasplantado y el cartílago hialino sano circundante, se ponen de manifiesto zonas de fibrocartílago desorganizado en la periferia de la lesión (Baum 2012).

Fig. 12. Valores T2 bajos. Las flechas señalan zonas de unión entre cartílago trasplantado y cartílago sano que se corresponden con estos valores.

Pero la disminución de la media global de los valores T2, siendo un dato sensible, se considera un dato inespecífico porque indica disminución del agua libre sin reflejar los cambios bioquímicos que están teniendo lugar en la matriz del cartílago.

Podría darse el caso que la media disminuya a expensas del incremento de valores bajo el rango de normalidad, que hemos visto se corresponde con fibrocartílago. Por esta razón es trascendente establecer el comportamiento de la Desviación Estándar (DE) y la variación zonal a lo largo del tiempo de seguimiento.

La disminución de la DE, es decir cuando los valores tienden a agruparse alrededor de la media, implican homogeneidad del tejido. A la inversa, incrementos en la DE se corresponden con heterogeneidad del tejido (Trattnig 2015). Valores T2 altos y valores heterogéneos definen el cartílago artrósico (Glaser 2006, Eckstein 2007, Baum 2013).

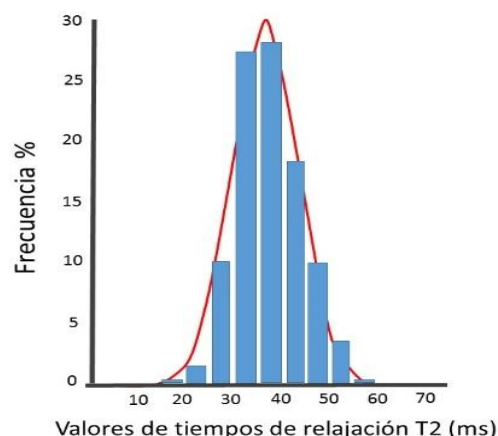
La correlación de valores T2 con cartílago hialino en rodillas humanas se sitúa en rangos entre 40 a 60 ms (Kim 2014) pero las mediciones dependen de las características del dispositivo de RMN empleado en cada estudio y del protocolo de adquisición, razón por lo que deben especificarse ya que son determinantes.

En nuestros ensayos clínicos, cuyos resultados se adjuntan en publicaciones anexas, hemos considerado el rango de normalidad de 30 a 50 ms dado que el interés inicial se centraba en demostrar las tendencias al incremento o descenso de valores sin exigir mayor precisión. Actualmente, en práctica clínica consideramos el rango de normalidad entre 30 y 45 ms. Valores T2 más elevados son típicos del cartílago deteriorado, indicando alteración de la red de colágeno e incremento del contenido hídrico del cartílago (Baum 2012).

Consideramos que tiene trascendencia clínica el hecho de haber observado una correlación positiva entre el descenso de la media de los valores T2 y la mejoría del dolor y la funcionalidad evaluados mediante la escala WOMAC (Dunn 2004; Baum 2013).

Fig. 13. Distribución de los valores de relajación T2. Obtenidos en mediciones de 9 sujetos sanos.

Se analizaron 88 ROI en cada rodilla. 24 en la rótula, 32 en los cóndilos femorales y 32 en los cóndilos tibiales. Media \pm DE=39.0 \pm 6,8 ms (n=792). Se evidencia una DE pequeña, típica de la arquitectura íntegra del cartílago (Orozco 2013). Dado que los datos corresponden a cartílago sano, se observa que los valores se agrupan siguiendo una distribución normal (Gaussian fitting $r=0,984$), alrededor del valor más frecuente, en nuestro caso 33-34 ms. Este es el valor de cartílago sano que venimos registrando con mayor frecuencia en nuestra práctica clínica habitual.



Representar los valores T2 en una distribución normal puede complementar la media global en el seguimiento de la artrosis ya que la distribución normal evidencia el grado de dispersión de los valores respecto a la media. Si la distribución es uniforme traduce homogeneidad del tejido, si los valores están dispersos traducen heterogeneidad del tejido (Dunn 2004).

Para referirse a esta variabilidad en los valores T2 se utilizan varios términos en la literatura, como «entropía» o «varianza». La entropía es la medida del desorden en una imagen, y alta entropía T2 implica la distribución menos uniforme de los valores T2. Varianza es la medida de la distribución de píxeles alrededor de la media. En sujetos con artrosis, se observa un incremento de la entropía y la varianza comparado con el cartílago normal, complementando la información de la media global T2. En sujetos sanos la media T2 es más baja y la varianza (DE) muestra valores más homogéneos que en pacientes con artrosis. Estas se incrementan a medida que avanza la degeneración (Joseph 2011, Baum 2013).

Si se pretende una evaluación más precisa de la estructura del cartílago puede efectuarse una medición de valores T2 desde la profundidad hasta la superficie de su espesor ya que cuando este es sano se observa un incremento progresivo de los valores T2 desde la capa profunda a la capa superficial. Es lo que se conoce como «T2 zonal».

Esta variación viene determinada por la distribución espacial de la red de colágeno y destacamos que no se ve afectada por el contenido en PG (Watrín Pinzano 2005). El «Índice T2 zonal» del cartílago estructurado que es (T2 profundo/T2 superficial), está comprendido entre 0,8 y 1,2 (Trattnig 2015).

Sin embargo la resolución que proporciona la tecnología de RMN de 1,5 T, que es la utilizada por nosotros, no es idónea para esta exploración (Levitt 2008; Binks 2013). Para estudiar el mapa zonal con tecnología de 1,5 T se precisa disponer de cartílago con grosor considerable y a ser posible de personas jóvenes.

La tecnología 3T aporta la mayor resolución que en este momento es aplicable en práctica clínica pero no ha estado a nuestra disposición durante el tiempo de realizar este estudio.

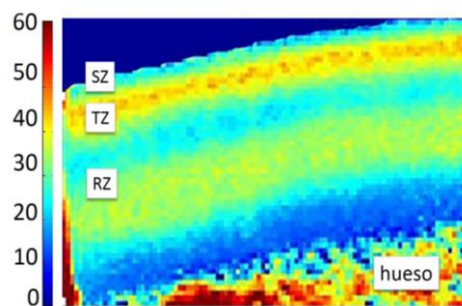


Fig. 14. Variación zonal del cartílago. Imagen cedida por Mrignayani Kotecha correspondiente a un mapa T2 zonal obtenida con tecnología de RMN de 9,4 T, aplicable solo a la investigación in vitro. (Kotecha 2013).

La localización del cartílago estudiado es otra variable importante a considerar.

En cartílago sano de personas con normoeje de la extremidad, las zonas de mayor carga, cuentan con una zona radial rica en PG que fijan el agua y restringen su movilidad condicionando un valor T2 menor (Eckstein 2008, Raynald 2008, Burstein 2009, Eckstein 2010, Buck 2011, Surowiec 2013, Bae 2015). Es decir el valor T2 muestra una correlación negativa con el espesor del cartílago (Dunn 2004; Hannila 2009), aspecto que hemos corroborado en nuestra muestra de pacientes (Fig. 15)

Cuando el proceso artrósico progresa van aumentando a su vez los valores T2.

Un análisis realizado tras el primer año de seguimiento de la cohorte del estudio de la OAI encontró una pérdida anual del 2% del volumen, siendo la pérdida mayor en cóndilo femoral medial, seguido por la zona más externa del cóndilo tibia medial (Eckstein 2009; 2011, Hunter 2010, Wirth 2009, 2010; Buck 2013; Jørgensen 2013).

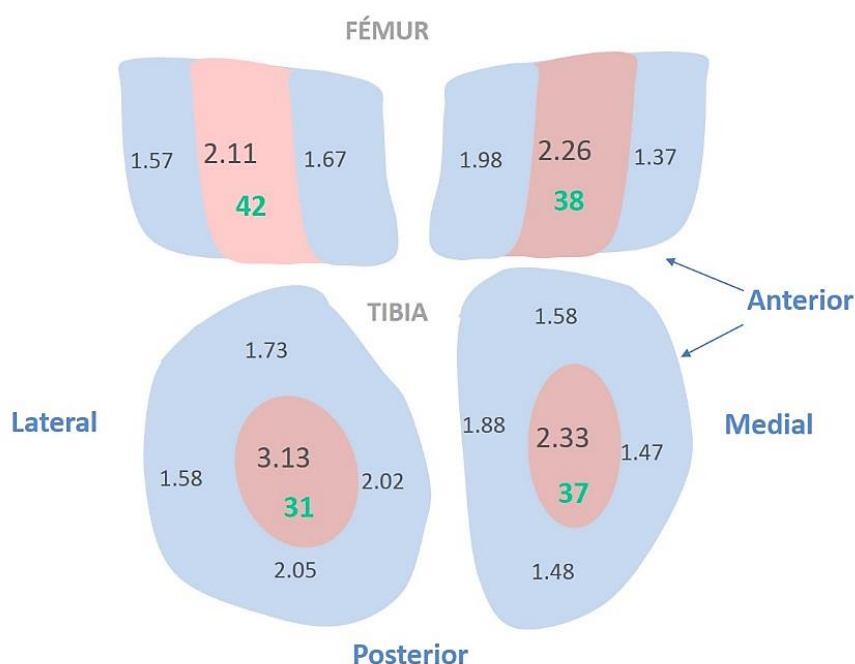


Fig. 15. Espesor del cartílago normal (mm) y T2 (ms) para distintos compartimentos. (Reichenbach 2009). Los valores T2 en ms se representan en números de color verde. Tomados de una muestra de 7 personas sanas, sin signos de artrosis (ITRT).

La RMN cuantitativa ha supuesto pues un avance importante en la investigación de la artrosis convirtiéndose en una herramienta indispensable para la investigación epidemiológica y el desarrollo de terapias modificadoras de la estructura del cartílago ya que esta técnica permite evaluar el cartílago de forma no invasiva y proporciona medidas de resultado muy sensibles, evitando la necesidad de realizar una artroscopia o una biopsia (Eckstein 2007; Welsch 2009; Crema 2011). En la actualidad, las medidas de los tiempos de relajación T2 son los biomarcadores no invasivos más utilizados en investigación para la evaluación del cartílago articular y el proceso de reparación del cartílago, considerados los más fiables y menos controvertidos en la literatura (Mosher 2011; Joseph 2012; Nishioka 2012; Baum 2013; Wong 2013; Jungman 2014).

En el marco de un acuerdo entre la «*Osteoarthritis Research Society International (OARSI)*» y la «*Federal Drug Administration (FDA)*», se ha creado un grupo de investigación para el desarrollo de biomarcadores específicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis y la evaluación de

la eficacia de nuevos fármacos modificadores de la artrosis, la «*OARSI–FDA Biomarkers Working Group*» (Kraus 2011; Bai 2011).

La «*Osteoarthritis Initiative (OAI)*» es una organización creada bajo los auspicios de la National Institute of Health (NIH) y bajo la asesoría y control de la FDA con el objetivo de analizar el comportamiento evolutivo de la gonartrosis y la eficacia de sus terapias.

El grupo de trabajo está compuesto por equipos de las universidades de Ohio, Pittsburgh y California y actúan como co-sponsors: Glaxo Smith Kline, Merck, Novartis y Pfizer. Este consorcio realiza un estudio multicéntrico observacional consistente en el seguimiento anual mediante analítica, radiografías y T2 mapping de 4.800 personas, divididas en varias cohortes. 3.500 personas bajo estudio son asintomáticas, de las cuales el 68 % presenta factores de riesgo de sufrir artrosis; 1.300 personas presentan artrosis establecida.

Se han publicado datos tras 6 años de seguimiento de este estudio a gran escala que incluye rangos de normalidad para diferentes técnicas de diagnóstico por la imagen (Joseph 2015). Por el momento el estudio confirma la regla del progresivo deterioro de la estructura cartílago artrósico cifrable mediante T2 mapping en un 4-6% anual (Eckstein 2006; Link 2011; Hunter 2011, Baum 2013).

1.3.2.2.4. Técnica de RMN T2 mapping aplicada en este estudio

En nuestro estudio evaluamos el valor obtenido en el seno del cartílago sin precisar las variaciones habidas en cada zona, considerando que es una medida suficiente para establecer la tendencia significativa ya sea en sentido de degeneración o de regeneración. La media de valores de relajación T2 (ms) se determinó en 88 regiones de interés bien definidas (ROI), incluyendo el cartílago rotuliano (24 ROI), cóndilos femorales (32 ROI) y cóndilos tibiales (32).

Para analizar los resultados del ensayo, los valores se promediaron en cada zona y los superiores a 50 ms, que representan mala calidad, remodelación o tejido inflamatorio, se consideraron para calcular el PCI o «*Poor Cartilage Index*» (expresado como porcentaje de todos los valores obtenidos en las 88 regiones de interés). Los valores superiores a 99 ms no se utilizaron para los cálculos. Para el PCI, el 100% representa el valor PCI peor posible y valores por debajo del 5% se consideran saludables.

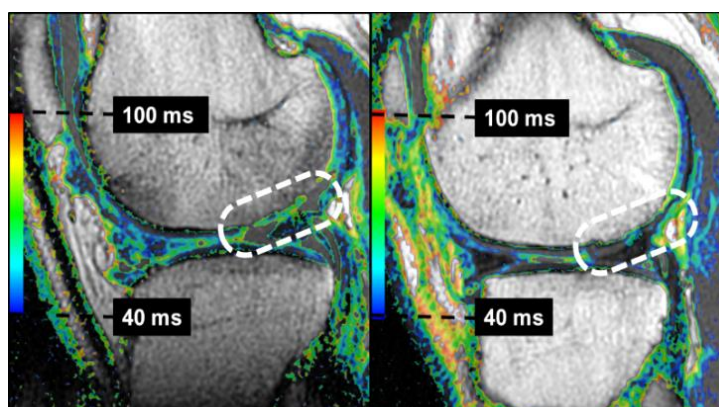


Fig. 16. Ejemplo de Mapa T2. La imagen muestra el mapa T2 de un paciente antes del tratamiento con MSC (izquierda) y 12 meses posteriores al tratamiento (derecha). La escala utilizada en este ejemplo es de 40ms-100ms. Valores T2 bajos aparecen en azul y valores T2 elevados en rojo. Las zonas «en vacío» de color gris están por encima de la escala indicada.

A los 12 meses se observa una disminución de los valores T2. Los valores superiores a 100ms han descendido a 60ms (azul-verde) y valores que estaban entre 60-70ms (verde) son ahora «invisibles» a esta escala (<40 ms).

1.3.2.2.5. Características del dispositivo de RMN

Las características del dispositivo que se utiliza en cada estudio en particular deben especificarse ya que son determinantes en el registro e interpretación de resultados.

Para realizar este tipo de técnica in vivo se requiere una bobina multicanal con un escáner de mínimo 1,5T que pueda realizar un mapa T2.

Secuencias de evaluación global del cartílago y medidas cuantitativas de la morfología del cartílago han sido validadas in vitro e in vivo y ya están disponibles mediante escáneres 1.5T y 3.0T (Dardzinsky 1997; Smith 2003; Dunn 2004; Nissi 2004; Li 2009; Welsch 2009).

Nuestros estudios son llevados a cabo en el Servicio de Resonancia Magnética de Clínica del Pilar de Barcelona, bajo responsabilidad de la Dra. Marina Huguet.

La técnica se realiza con un equipo de 1,5 T de General Electric con gradientes de 40 mT/m, utilizando una antena de 4 canales específica para el estudio de rodilla.

1.3.2.2.6. Protocolo de Adquisición.

Se inicia la exploración con el protocolo estándar de rodilla, incluyendo las secuencias sagital T1, axial T2, sagital gradiente de eco y coronal densidad T2.

Se añade la secuencia específica T2 mapping en el plano axial para el estudio de la articulación fémoro-patelar y en el plano sagital para la articulación fémoro-tibial.

Los parámetros de adquisición de la secuencia T2 mapping para el plano axial son: TR 1000, TE:13.1, 26.2, 39.3, 52.4, 65.5, 78.6, 91.7, 105; FOV: 180 x 180 mm; Frecuencia 288; Fase 288; bandwidth 15.63. La secuencia dura aproximadamente unos 10 minutos.

Para el plano sagital, la secuencia T2 mapping muestra los siguiente parámetros: TR 1375; TE:10.8, 21.6, 32.4, 43.2, 54, 64.8, 75.7, 86.5; FOV: 180 x 180 mm; Frecuencia 288; Fase 288; bandwidth 20.83. El tiempo de adquisición de dicha secuencia alcanza los 13 minutos. El postprocesado de la imagen se realiza gracias a un software específico, que calcula el tiempo de relajación T2 en milisegundos (ms) de las distintas regiones del cartílago.

En cada rodilla se determinan 88 regiones de interés bien definidas (ROI), incluyendo las dos facetas rotulianas (24 ROI), cóndilos femorales (32 ROI) y cóndilos tibiales (32 ROI).

Ajustando la ROI en el seno del cartílago, obtenemos un valor cuantitativo de relajación T2 en cada localización específica que nos sirve de referencia para estudios comparativos en controles posteriores. Los datos del estudio inicial, las áreas de interés y los resultados en cada localización, son grabados en formato digital, para poder ser comparados con los estudios de seguimiento.

1.3.2.2.7.1. Cálculo de variabilidad del dispositivo (RMN)

A un voluntario sano se le realizaron tres RMN de rodilla sucesivas en el tiempo, sin intermediar ningún lapso. Se obtuvieron tres medidas de cada ROI del mapping (FES1 a TIL4). La matriz de datos se formó por 88 filas y tres columnas. Para valorar la dispersión de las medidas realizadas en un mismo individuo se siguió el siguiente razonamiento:

El mejor método para acercarse al verdadero valor de lo medido es que la medida se haga independientemente varias ocasiones y luego promediar los valores obtenidos. Los errores accidentales se compensan haciendo varias medidas. Así pues la mejor estimación del verdadero valor de cada medida será la media de los tres valores observados (MedVALOR). Para averiguar la dispersión o variabilidad de estas medidas se calcularon las desviaciones de cada medida respecto a la media de las tres medidas en valor absoluto, o sea, sin tener en cuenta el signo de la diferencia sino la distancia que hay hasta la media.

Se calculó esta desviación en tanto por ciento de la auténtica medida que su mejor estimación es la media (MedValor), para las tres medidas DIF (1-Med), DIF (2-Med) y DIF (3-Med).

$$\text{DIF (1 - Med)FESn} = \frac{(\text{Difn})}{\text{MedValor}} \times 100$$

$$\text{DIF(1 - Med)FES1} = \frac{(38 - 36,667)}{36,667} \times 100 = 3,636$$

$$\text{DIF(2 - Med)FES1} = \frac{(37 - 36,667)}{36,667} \times 100 = 0,909$$

$$\text{DIF(3 - Med)FES1} = \frac{(35 - 36,667)}{36,667} \times 100 = 4,545$$

	RMN 1	RMN 2	RMN 3	Med valor	Med	Med	Med	Med Varia
FES 1	38	37	35	36,667	3,636	0,909	4,545	3,030
FES 2	39	34	33	35,333	10,377	3,774	6,604	6,918
FES 3	38	33	30	33,667	12,871	1,980	10,891	8,581
FES 4	31	30	32	31,000	0,000	3,226	3,226	2,151
FEM 1	40	39	39	39,333	1,695	0,847	0,847	1,130
FEM 2	40	37	37	38,000	5,263	2,632	2,632	3,509
FEM3	34	30	33	32,333	5,156	7,216	2,062	4,811
... + 81

Tabla 1. Fragmento de tabla para cálculo de la variabilidad en el análisis de los ROI.

Después de calcular las tres desviaciones en tanto por ciento se halló la media de esta desviación o variabilidad (MED-Varia), en el caso de FES1 es 3,03%.

La distribución de la variable media de las variabilidades en sujeto sano es:

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típ.
MED VAR.	88	0.0000	10,6667	3,4850	2,1900

Tabla 2. Distribución de las variables en sujeto sano

Puede calcularse el intervalo de confianza de 95% de la estimación de la media de esta variable, siendo

$$\bar{X} \pm Z_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{N}} \text{ en nuestro caso es } 3,485 \pm 1,96 \times \frac{2,19}{\sqrt{88}} = 3,85 \pm 0,4576$$

Puede afirmarse que el intervalo 3,021 y 3,949 %, tiene una probabilidad del 0,95 de contener la verdadera variabilidad de estas medidas. Se tomó como medida de esta variabilidad el valor máximo 3,949 %, redondeando 4%, que corresponde al valor más extremo para una confianza del 95%.

Variabilidad del dispositivo (RNM) = 4%

1.3.2.2.7.2. Cálculo de variabilidad Intraobservador

Para cuantificar la dispersión o variabilidad de un observador se han medido (valorado) las RMN de 10 pacientes en dos momentos distintos por el mismo especialista. Así se ha obtenido una matriz de 20 X 88 (1760 medidas), que corresponden a 88 ROI.

Para valorar la dispersión se han tomado los dos valores medidos por el observador para cada variable ROI (FES1 a TIL4). La media de estas dos observaciones es la mejor estimación del verdadero valor de esta variable. Calculamos la media de las 880 parejas de observaciones.

	Valor A	Valor B	Media A - B	Dif A-Med	Variab.
FES 1	42	38	40,0	2,0	5,000
FES 2	42	42	42,0	0,0	0,000
FES 3	41	42	41,5	-0,5	1,205
FES 4	40	41	40,5	-0,5	1,235
FEM 1	55	55	55,0	0,0	0,000
FEM 2	57	54	55,5	1,5	2,703
FEM 3	43	45	44,0	-1,0	2,273
... +81

Tabla 3. Fragmento de tabla para el cálculo de la variabilidad intraobservador

Hallamos la diferencia de cada una de las dos medidas respecto la media, tomará el mismo valor uno en positivo y el otro en negativo. Tomando esta diferencia en valor absoluto y dividiendo por la media y multiplicado por 100, tendremos esta variación en tantos por ciento de la mejor estimación del verdadero valor.

Estadísticos descriptivos

	N	Mín.	Máx.	Media	Des. Tip.
Variab.	880	0,000	23,077	2,83736	2,606353

Tabla 4. Estadísticos descriptivos de la variabilidad intraobservador en ms.

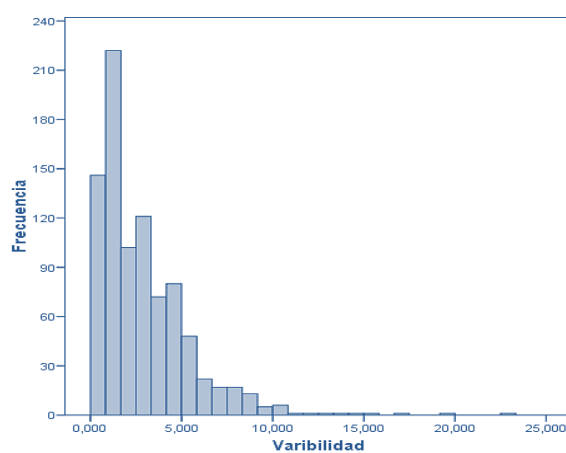


Fig. 17. Histograma de Distribución de las variables de 10 pacientes estudiados

Esta variable se distribuye con media 2,873 y desviación típica de 2,606. Calculamos el Intervalo de Confianza del 95% de la media de esta variable dándonos $2,837 \pm 0,172$, lo cual nos permite afirmar que el intervalo 2,6651 y 3,009 tiene una probabilidad de 0,95 de contener la verdadera media de la variabilidad del observador.

Afirmamos que 3,01 % es el valor máximo de la media de la variabilidad para una confianza del 95%. Para las 880 parejas de valores, 870 contienen valores menores de 90 ms, hemos realizado el mismo tratamiento de la variabilidad y esta variable sigue una distribución de media 2.799 y desviación típica 2,524.

El Intervalo de confianza de la media es 2,631 y 2,967. Así podemos afirmar que 2,967%, (redondeando el 3%) es el valor máximo de la media de la variabilidad para una confianza del 95% de los valores menores de 90 ms.

Variabilidad intraobservador = 3%

Los valores de relajación T2 sólo se consideran un biomarcador fiable si el error de reproducibilidad es menor que la diferencia entre los T2 de cartílago sano y los del cartílago artrósico. Se ha demostrado que los valores T2 en artrosis son al menos un 12% mayores que los del cartílago sano (Li 2009, Joseph 2011, Baum 2012). En nuestro caso consideramos una variabilidad del 7 %, suma del dispositivo y el observador.

1.3.2.2.7.3. Cálculo de la Variabilidad interobservador

Aunque en este estudio sólo ha actuado con un «observador», especialista en radiología, para registro y evaluación de los datos de las imágenes de RMN, parece útil describir la valoración de la variabilidad que sucede cuando el registro de datos lo realizan dos especialistas diferentes.

Para cuantificar la variabilidad entre observadores, participaron dos especialistas en radiología con experiencia en valoración de RMN. A cada uno de ellos se le facilitó las mismas RMN de 25 pacientes para su valoración independiente, sin tener cada uno de ellos conocimiento de los valores facilitados por el otro especialista.

Por tanto dispusimos de la valoración de 25 RMN por dos especialistas, la matriz de datos constaba de 50 filas y 88 columnas dándonos 4400 observaciones.

Para averiguar la variabilidad formamos la matriz donde figuró cada paciente (25) y cada valor dado por cada observador (RadioA, RadioB) para cada una de las variables (FES1 a TIL4). La media de estas dos observaciones es la mejor estimación del verdadero valor de esta variable. Calculamos la media (Media) de las 2200 parejas de observaciones y al establecer las diferencias entre cada valor y la media obtuvimos el mismo valor pero uno positivo y el otro negativo. Hallamos la diferencia en valor absoluto de uno de los observadores con respecto esta media lo dividimos por la media y multiplicamos por 100 para convertir la diferencia en un tanto por ciento de la verdadera medida (variabilidad de los observadores) VAR (A,B).

	Radio A	Radio B	Medida	Media	Dif(R_A-Med)	VarA,B
PAC 1	30	30	FES1	30,0	0,0	0,000
PAC 2	39	40	FES1	39,5	-0,5	1,266
PAC 3	38	36	FES1	37,0	1,0	2,703
PAC 4	33	30	FES1	31,5	1,5	4,762
PAC 5	43	44	FES1	43,5	-0,5	1,149
PAC 6	579	600	FES1	589,5	-10,5	1,781
PAC 7	289	279	FES1	284,0	5,0	1,761
PAC 8	190	195	FES1	192,5	-2,5	1,299

Tabla 5. Fragmento de tabla para el cálculo de la variabilidad interobservador

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
VarA,B	2200	,000	45,205	2,54194	3,053326

Tabla 6. Variabilidad interobservador

Calculamos el intervalo de confianza del 95% de la estimación de esta media dándonos los valores $2,54194 \pm 0,128$, lo que nos permite afirmar que los valores 2,414 y 2,670 % tienen una probabilidad de contener la verdadera media de la estimación de la variabilidad entre estos dos especialistas. Podemos afirmar que el valor máximo de la estimación de la variabilidad sería 2,67%, redondeando 3%.

Variabilidad Interobservador 3%

1.3.3. Tratamientos de la gonartrosis

Los principales objetivos del tratamiento no plantean la regeneración del cartílago dañado pero sí modificar la sintomatología aliviando el dolor y el malestar, reducir la inflamación y minimizar la incapacidad funcional. También retardar en lo posible la progresión del proceso, modificando la estructura del cartílago y minimizando la pérdida del espacio articular. Todo ello minimizando el riesgo de efectos secundarios y de interacciones con otros tratamientos.

Se han propuesto múltiples tratamientos que muestran eficacia dispar (Bijlsma 2011). De hecho la «*American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS)*» recomienda solamente el tratamiento físico-educacional, el tratamiento sintomático con AINE y en ciertos casos, la infiltración local de corticoides. No existe posicionamiento definitivo sobre el PRP y se está en contra de la administración de HA (Jevsevar 2013).

1.3.3.1. Tratamiento no farmacológico

La base de la terapia no farmacológica de la artrosis la constituye la educación del paciente y el ejercicio. Probablemente es el aspecto más importante coadyuvante a cualquier tratamiento puesto que repercutirá en las acciones que posteriormente se desarrollen. El paciente debe conocer su enfermedad y las posibilidades evolutivas de la misma, siendo importante transmitirle que la enfermedad sólo excepcionalmente es invalidante.

Se recomienda perder peso en los pacientes obesos; un buen control ponderal por si solo puede obtener una mejoría sintomática además de ralentizar la progresión de la enfermedad. La pérdida de peso es la primera opción de descarga articular. Cuando se considera conveniente se refuerza con la marcha entre bastones y otras medidas como plantillas correctoras del varo o valgo que pueden tener influencia en la distribución de cargas de la rodilla. El efecto de la obesidad sobre la artrosis de rodilla no es sólo mecánico, también se han implicado factores genéticos y metabólicos. Investigaciones sobre las adipocinas sintetizadas por los adipocitos y cuyos niveles son superiores en las mujeres, indican que estarían implicadas en la destrucción del cartílago y la aparición de osteofitos (Pottie 2006).

Alteraciones de la alineación articular y congruencia articular o una distribución anómala de las cargas de presión, como son en el genu valgo, genu varo, genu recurvatum y la dismetría de extremidades inferiores, son factores que favorecen la aparición de artrosis; suelen asociarse a otro factor que es la atrofia del músculo cuádriceps. Actuaciones mediante plantillas ortopédicas correctoras y ejercicios isométricos de potenciación de cuádriceps son elementos indispensables en el arsenal terapéutico.

La articulación afectada debe quedar protegida de movimientos o esfuerzos susceptibles de exacerbar la clínica como flexiones constantes, subir escaleras y andar por terrenos irregulares o con pendientes pronunciadas. Existe poca evidencia sobre los efectos del ejercicio programado aunque, según la opinión de los expertos reflejada en las recomendaciones la «*Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas (EULAR)*», es el primer tratamiento que se debe instaurar de acorde con el paradigma: el movimiento favorece al cartílago, la inmovilización lo deteriora. El ejercicio aeróbico de baja intensidad mejora la fuerza muscular, la capacidad funcional y el grado de actividad física; disminuyendo también el dolor y por consiguiente la utilización de fármacos. Por el contrario, el ejercicio de alta competición que conlleve traumatismos repetidos y sobreesfuerzo, parece acelerar el proceso artrósico.

La sobrepresión articular que puede derivar de la práctica deportiva exigente, actúa sobre los condrocitos y estimula la aparición de citoquinas pro-inflamatorias que desencadenan la aparición de enzimas que degradan la matriz cartilaginosa. Este proceso desencadena la

aparición de fisuras, edema y destrucción de la estructura de colágeno y de los PG. La sobrepresión del cartílago se produce por causas externas a la articulación y por aumento de la rigidez del hueso subcondral que pierde elasticidad y disminuye su función amortiguadora de las presiones sobre el cartílago (Monfort 2006).

La termoterapia con frío y calor ha sido recomendada para el tratamiento inicial en artrosis. El calor local mejora el espasmo muscular y reduce la rigidez propia de la artrosis (Brosseau 2014). La aplicación de calor puede ser superficial o profunda. Mientras el calor superficial se genera por conducción -paños calientes, calor húmedo, parafina-, por radiación -infrarrojos- o por convección -vapor-, el calor profundo se aplica con onda corta, microondas y ultrasonidos.

Según revisión realizada por Cochrane, se observa que no hay diferencias significativas en la utilización de ultrasonidos versus placebo, ni ultrasonidos continuos versus corriente galvánica, ni ultrasonidos en pulsos o continuos versus onda corta (Rutjes 2010).

El frío se aplica mediante masajes con hielo o la aplicación de bolsas de hielo. Los masajes con hielo consiguen una mejoría estadísticamente significativa de la fuerza y de la amplitud de movimiento, aunque no del dolor; mientras que con la aplicación de bolsas de hielo no hay diferencias significativas en el alivio del dolor comparado con placebo (Brosseau 2014).

Se dispone además de múltiples terapias físicas: fisioterapia, termoterapia, ultrasonidos, campos electromagnéticos, fitoterapia y acupuntura, cuyos efectos son dudosos. (Witt 2005; Manheimer 2010; Rutjes 2010; Hawker 2011; Choi 2011; Fary 2011).

1.3.3.2. Tratamiento farmacológico

1.3.3.2.1. Fármacos modificadores de los síntomas

Paracetamol

Es una opción para el alivio sintomático del dolor si no existe inflamación subcondral y/o sinovial (Jordan 2003). Su perfil de seguridad superior al de los AINE y su bajo coste hacen que sea uno de los fármacos más prescritos para el tratamiento de la artrosis.

Se receta con precaución en pacientes con enfermedades hepáticas y muy especialmente en los pacientes enólicos. Dosis superiores a 3 g/día pueden ser gastrolesivas y también producir aumento de la presión arterial (Roberge 2003). Por tanto, debe administrarse con precaución en pacientes con antecedentes de riesgo.

Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Recomendados cuando el dolor experimentado por el paciente no mejora con paracetamol. Suele ser un tratamiento preferido por su eficacia, aunque puede presentar múltiples efectos secundarios (gastropatía, toxicidad renal, toxicidad hepática, alteraciones de la agregación plaquetaria, retención hidrosalina con consecuencia de edemas, descompensación de insuficiencia cardíaca e hipertensión arterial). El grupo de los coxibs (antiinflamatorios COXs-2) presentan un mejor perfil de seguridad gastrointestinal en general, así como una menor incidencia de úlcera gastroduodenal en particular, sin embargo se han puesto en cuestión su seguridad cardiovascular.

Opioides

Analgésicos narcóticos de acción central, son un grupo de fármacos usados para el tratamiento sintomático de la artrosis con dolor moderado o intenso. Por su frecuencia de uso, podríamos destacar la combinación de codeína con paracetamol.

Se recomiendan con precaución debido a sus múltiples efectos secundarios como náuseas, vómitos, estreñimiento y vértigo (Kjaersgaard-Andersen 1990).

El tramadol es un analgésico de acción central que constituye una alternativa eficaz en pacientes que no pueden ser tratados con AINE. Ha demostrado ser eficaz en el alivio del dolor de pacientes artrósicos que presentan dolor basal importante o brotes de dolor en los que los AINE se han mostrado ineficaces.

En los últimos años, se ha añadido el uso de fentanilo y buprenorfina transdérmicos al amplio espectro de fármacos para el tratamiento del dolor crónico artrósico. Ambos fármacos presentan un buen perfil de eficacia/seguridad siempre y cuando se realice su correcta prescripción.

1.3.3.2.2. Fármacos modificadores de la estructura del cartílago (DMOAD).

Condroitín sulfato

Es un glicosaminoglicano sulfatado, que promueve la síntesis de PG. Tiene un importante tropismo para los tejidos cartilagosos, efecto antiinflamatorio y carece de efectos nocivos gástricos, plaquetares y renales (Ronca 1998). Reduce la actividad catabólica de los condrocitos inhibiendo algunas enzimas proteolíticas y también es capaz de reducir la síntesis de ON en los condrocitos articulares humanos artrósicos. Tiene un efecto positivo sobre el desequilibrio del hueso subcondral que se produce en la artrosis (Martel-Pelletier 2005) y a nivel de membrana sinovial aumenta la síntesis de HA endógeno. Su seguridad está ampliamente demostrada.

Sulfato de glucosamina

Es el principal componente de las unidades de disacáridos presentes en los PG de la matriz del tejido conjuntivo. Presenta un discreto efecto antiinflamatorio y sobre la síntesis de PG en los cartílagos articulares (Müller-Fassbender 1994). Inhibe algunos enzimas destructores del cartílago.

Diacereína

Tiene un mecanismo de acción que difiere totalmente de los antiinflamatorios y se basa en la prevención de la pérdida de glicosaminoglicanos y de colágeno a través de la inhibición de IL-1. Ha demostrado sus propiedades como fármaco modificador de la estructura. Presenta el inconveniente de provocar un alto porcentaje (30-40%) de efectos adversos gastrointestinales.

Analgésicos tópicos

Sólo puede afirmarse que son más eficaces que placebo en la reducción del dolor y no tiene los efectos adversos observados en la administración por vía oral (Eberhardt 1995; Rosenstein 1999).

1.3.3.2.3. Tratamientos intrarticulares

Ácido Hialurónico (HA)

Si bien existe debate sobre el efecto real que pueda tener el tratamiento con HA (Samson 2007), puntualmente de uso no aconsejado por asociaciones médicas (Jevsevar 2013, Mcallindon 2014), puede afirmarse que las inyecciones intrarticulares de HA tienen potencial efecto terapéutico sobre el dolor y la función de la rodilla. Los beneficios pueden apreciarse aproximadamente un mes después de la primera inyección y duran unos seis meses.

Este es el resumen de los resultados de un metaanálisis que incluyó 29 ensayos clínicos, publicados en revistas científicas indexadas, evaluadas por pares, en los que en total habían participado 4.866 pacientes (Miller 2013)

Resulta interesante observar que la fragmentación del HA en el líquido sinovial estimula la expresión de MMP. Por tanto, la depolimerización del HA del líquido sinovial que acontece en la artrosis puede contribuir al incremento de enzimas degradantes y da sentido a la utilización

clínica del HA exógeno, ya que éste estimula la producción de HA endógeno.

Se ha sugerido que los efectos de los preparados de HA con un PM superior a 1×10^6 Da son clínicamente mejores. Los estudios in vitro que analizan los efectos del HA sobre los condrocitos y algunos estudios clínicos también parecen corroborar esta opinión; sin embargo, es posible que cuando se desea un efecto más allá de la superficie cartilaginosa, tal es el caso del hueso subcondral, ligamentos o meniscos, los preparados de bajo PM sean más apropiados porque difunden mejor.

Por tanto se otorga cierto grado de eficacia del HA en el tratamiento de la artrosis, sin embargo los ensayos clínicos que han confrontado esta terapia con el P-PRP han demostrado que este último ejerce mayor control sobre la inflamación y el dolor, repercutiendo en una mayor mejoría los síntomas y la recuperación funcional articular (Kon 2011, Filardo 2012, Vaquerizo 2013, Liu 2014).

Cortisona

Aunque en estudios controlados con placebo la infiltración articular de corticoide sólo fue superior a éste en las 3 primeras semanas y es un tratamiento no exento de contraindicaciones y complicaciones, es un recurso terapéutico que se tiene en cuenta en caso de episodios inflamatorios agudos y si el tratamiento farmacológico oral falla.

Su uso requiere formulaciones retardadas o de depósito con menor solubilidad y una mayor persistencia y duración del efecto local. En cualquier caso se desaconseja practicar este tratamiento de forma repetida.

Orthokine

Existe una modalidad de tratamiento relacionada con las citoquinas que se basa en la obtención de suero autólogo rico en IL-1ra, que actúa bloqueando los receptores para IL-1.

Existen varias isoformas de IL-1ra, las secretadas (sIL-1ra) y las intracelulares (icIL-1ra) y pueden ser liberadas por distintos tipos celulares tales como neutrófilos, macrófagos, condrocitos y fibroblastos sinoviales. El suero obtenido con este procedimiento (IRAP. Orthokine) contiene, además, algunos FC (FGF-1, HGF, TGF- β 1).

Si bien es un procedimiento a considerar, entendemos que exige un trasiego de producto hematológico fuera del centro de aplicación, una manipulación sustancial y un almacenamiento que lo convierte en un producto de características farmacológicas, «medicamento», que como tal debería tratarse y su aplicación someterse a la normativa que contempla entre otros aspectos el control de la «trazabilidad» y la «seguridad de uso». (Frisbie 2005, McIlwraith 1996, Jarloev 2007).

Aspirados de médula ósea y tejido adiposo («fracción vasculo estromal» «FVS»)

Se han publicado algunos artículos sobre estos procedimientos con resultados positivos que deben tenerse en consideración (Mazzoca 2010; Beitzel 2012; Koh 2012,2015).

Administrativamente se consideran una «manipulación no sustancial» (Reglamento (CE) 1394/2007) y como sucede con los autoinjertos pueden aplicarse sin la restricción y control que imponen las terapias avanzadas, evitando la obligación de obtener datos de eficacia terapéutica y de un aspecto crítico que es la «seguridad de uso» (Turner 2016). Esta deficiencia podría subsanarse si se exigiera la aplicación de la regulación (Ley 29/2006, Directiva 2009/120/CE).

Estos productos suelen basarse en la cantidad de MSC que contienen cuando en realidad sólo pueden definir una fracción celular muy heterogénea entre las que se pueden encontrar escasas MSC en estado letárgico G_0 . La cantidad del digamos «excipiente» es del 95% en el caso de la mejor recolección de AT-MS, siendo su composición muy heterogénea, incluyendo células hemáticas, polinucleadas y detritus celulares susceptibles de generar un cuadro inflamatorio.

En humanos adultos la proporción de MSC en médula ósea (MO) varía de 1 MSC entre cada 10.000 a cada 100.000 MNC. La proporción de MSC en tejido adiposo es mayor, pudiendo

obtener mediante centrifugación fracciones vasculoestromales con un máximo del 5% de contenido celular mesenquimal aunque también en estado G₀. Por esto consideramos que su posible eficacia deriva de factores plaquetarios y otras citoquinas u exosomas que puede contener este tipo de suspensiones celulares cuyo contenido mesenquimal se estima por selección y cultivo de una muestra apartada del producto que se aplicó, dotándola de un medio adecuado para su supervivencia y entrada en ciclo celular. Mientras que las MSC en G₀ del producto realmente administrado competirán por el oxígeno y nutrientes con las células acompañantes que le superan en enorme proporción.

Hemos debatido estos conceptos en la revista «*Arthroscopy*» (Soler 2012). Otros autores también se han expresado en términos parecidos, insistiendo en la imperiosa necesidad de adoptar una nomenclatura correcta para estos procedimientos que evite la confusión con la auténtica terapia con células mesenquimales troncales (Ha 2014; Orozco 2015).

1.3.3.3. Tratamiento quirúrgico

Los defectos del cartílago se reparan con tejido de reparación consistente en tejido fibroso o fibrocartílago que es biomecánicamente inferior al cartílago hialino y se deteriora rápidamente cuando se somete a un ejercicio continuo (Otto 2004).

En un intento de estimular la reparación, en algunas lesiones del cartílago de grosor parcial y extensión limitada, se practican perforaciones, abrasiones y microfracturas terapéuticas hasta llegar a hueso esponjoso subcondral para favorecer la llegada de MSC con potencial condrogénico procedentes de la médula ósea subyacente al cartílago pero el tejido de reparación, si llega a formarse, es histológicamente diferente al cartílago articular, por lo que la reparación es defectuosa (Fickert 2003; Poole 2003).

Fragmentos procedentes de la degradación de componentes de la matriz contribuyen a estimular la expresión de genes proinflamatorios por esto, parece que puede ser útil eliminar por vía artroscópica los pequeños fragmentos de cartílago desprendidos -«toilette articular»- o efectuar el afeitado -«shaving»- del cartílago fibrilante aunque no se fomente la cicatrización. Sin embargo diversos estudios apuntan que este tipo de intervenciones no tienen efectos significativamente superiores al placebo (Moseley 2002; Samson 2007; Kirkley 2008; Laupattarakasem 2008).

Se ha experimentado con el uso de autoinjertos osteocondrales obtenidos de zonas de aparente carga mínima de la misma articulación. Sin embargo, se ha demostrado que las zonas donadoras están sujetas a sollicitaciones mecánicas mayores a las previstas por lo que son también vulnerables (Torzilli 1999).

El cartílago de los injertos y el de la periferia del defecto sufren cambios degenerativos y generalmente no se integran. También puede suceder que la superficie articular enfrentada se lesione por la incongruencia de la superficie de los injertos y la de la periferia de la lesión.

La condición inflamatoria de la artrosis reconocida actualmente, limita la aplicación a lesiones traumáticas u osteocondritis focales, los injertos osteocondrales, el trasplante de condrocitos u otros recursos de ingeniería tisular que combinan materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables como estructuras de sostén (Ocelus 2000; Brittberg 2001).

Cuando las áreas degeneradas o lesionadas son amplias, sobre todo si se presentan en ambas superficies femorotibiales enfrentadas, no parece que ninguna terapia actual pueda ser realmente eficaz, salvo las paliativas medicamentosas, fisioterapéuticas o rehabilitadoras en espera de la artroplastia.

Por tanto, aunque se conozcan los mecanismos fisiopatológicos de la artrosis y las posibilidades terapéuticas sobre dianas específicas comienzan a aparecer, puede decirse que por el momento

sigue aceptándose el aforismo de Hunter según el cual «una vez que el cartílago se destruye, nunca se cura» (Hunter 1743).

En algunos casos incipientes y cuando existe uno de los compartimentos femorotibiales indemne, pueden plantearse osteotomías correctivas del eje de la extremidad con objetivo de descargar el compartimento afectado pero esta indicación suele limitarse a grados de artrosis menos avanzados por el inconveniente que representa una intervención previa sobre una probable futura artroplastia. En determinadas afectaciones rotulianas pueden también plantearse intervenciones de descarga o realineaciones actuando sobre partes blandas.

La sustitución protésica ha representado uno de los mayores avances logrados por la cirugía ortopédica. Cuando la destrucción articular es importante, la prótesis total de rodilla puede permitir al paciente volver a desempeñar sus actividades diarias pero esta cirugía articular mayor, especialmente en pacientes jóvenes, sólo se recomienda en casos extremadamente invalidantes y cuando el tratamiento digamos conservador haya fracasado (Jevsevar 2013; Bijlsma 2011).

1.4. TRATAMIENTO CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Las plaquetas, en respuesta a determinados estímulos, liberan citoquinas y otras proteínas señalizadoras con funciones biológicas fundamentales. Algunas de estas proteínas reciben el nombre de «Factores de Crecimiento (FC)».

«Citoquinas» es un término impreciso aunque muy utilizado que define proteínas pequeñas que una vez liberadas por la célula al espacio extracelular afectan al comportamiento de otras células. Es un término muy genérico que se refiere por lo general a interleuquinas, linfoquinas, quimioquinas y otras moléculas de señalización relacionadas como TNF e interferones. Generalmente no suele referirse a los FC como citoquinas con la única excepción del TGF. De todos los FC liberados por las plaquetas, los que se encuentran en mayor concentración, cuya estructura y función ha sido ampliamente estudiada son el PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) y el TGF-beta (Transforming-Derived Growth Factor). Estos FC se comportan como proteínas señalizadoras que regulan procesos celulares clave como la diferenciación, la mitogénesis y la quimiotaxis, estos mecanismos son clave en los mecanismos de regeneración de los tejidos del aparato locomotor.

La composición del PRP es compleja ya que, además de las plaquetas, contiene algunos eritrocitos, leucocitos, MSC circulantes y varias proteínas séricas, como el fibrinógeno, fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina, que intervienen en el proceso de curación. Sin embargo, el componente que motiva más interés son los FC plaquetarios contenidos en los gránulos α y que se liberan durante el proceso de activación plaquetaria. Tras la administración del PRP, se estima que la liberación de los FC se va produciendo durante las siguientes 92 horas, si no se añade ningún activador plaquetario como el Cl_2Ca antes de la administración. Los FC se unen a los receptores tirosina-kinasa (TKR) de las membranas celulares. Los TKR son proteínas que, desde la membrana citoplasmática, se extienden hacia el interior del citoplasma de la célula. Tras la unión FC-TKR se activan proteínas mensajeras en el citoplasma mediante una reacción en cascada. Estas proteínas llegan al núcleo y activan los genes responsables del control de la división celular. En consecuencia, se induce la transcripción de RNA-m, produciéndose una respuesta biológica que inicia las cascadas bioquímicas que inducen la reparación/regeneración tisular. Se desconoce la duración de la unión FC-TKR.

Los FC pueden tener tres mecanismos de acción diferentes. Pueden actuar de forma paracrina estimulando célula vecina; autocrina actúan sobre sí mismas incrementando su actividad y de forma endocrina influenciando a una célula de un fenotipo diferente y distante anatómicamente. La mayoría de FC presentes en el PRP pertenece al grupo de los mitogénicos. Los más conocidos

son: platelet derived growth factor (PDGF), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), transforming growth factor-B (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), hepatocyte growth factor (HGF), growth/differentiation factor (GDF). Existen formas isoméricas para muchos de ellos que se cree que son específicas para ciertos tejidos.

Los FC no son exclusivos de las plaquetas y muchos de ellos se sintetizan y encuentran en otros tejidos. El IGF-I, por ejemplo, se sintetiza en el hígado; las plaquetas no contienen IGF-I o su contenido es mínimo. Pero existe una correlación positiva entre la concentración de plaquetas y la concentración de factores de crecimiento y las concentraciones de FC están positivamente correlacionadas con la expresión de los genes responsables de la síntesis de la MEC. Es decir, si la concentración de plaquetas es alta, hay más FC y se ha demostrado la relación dosis-dependiente entre algunos FC y la síntesis de algunos componentes. Algunos FC como el TGF tiene un efecto antiinflamatorio mediante la neutralización o inhibición de la expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 (van Miert 2002). Esta característica es explotable en el tratamiento de la artrosis pero es de gran importancia administrar un PRP con bajo contenido leucocitario y por tanto disminuir el aporte de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) que puedan contrarrestar este efecto.

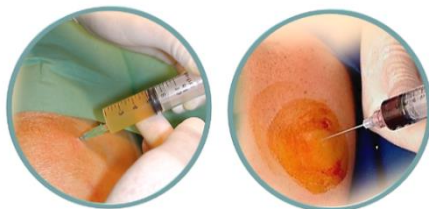


Fig. 18. Ejemplos de aplicación de PRP. La imagen muestra dos tratamientos con PRP obtenidos con distintos procedimientos resultando un aspecto diferente evidente. El de la derecha presenta evidente contenido de hematíes (color rojo) y por definición alto contenido leucocitario.



Fig. 19. Aspecto del PRP. La imagen muestra dos tratamientos con PRP obtenidos en este caso con el mismo procedimiento pero resultando un aspecto diferente evidente por defecto técnico en el proceso. El de la derecha presenta evidente contenido de hematíes mezclados en la fracción que debería ser plaquetaria pura y por definición esta presentará un alto contenido leucocitario igual que el caso anterior.

Es probable que la concentración de plaquetas aun siendo importante se haya sobreestimado. Los FC actúan por unión a los receptores presentes en la superficie de las membranas celulares y activando cascadas de señales intracelulares. Una vez que los receptores han sido ocupados por los FC, estos son internalizados por la célula de forma que el estímulo de esa señal no actúa de forma perpetua. Es decir, cuando los receptores celulares se han saturado, la adición de más factores de crecimiento no parece tener mucho sentido. En conclusión, no hay un motivo claro para utilizar procedimientos o tecnología por los que se obtiene una concentración de plaquetas superior a cuatro veces la concentración basal.

El uso del PRP en con bajo contenido leucocitario (P-PRP) en el tratamiento de la gonartrosis fundamenta pues en que contiene FC con potenciales efectos anabólicos sobre los condrocitos e induce la síntesis de matriz extracelular (Hickey 2003; Schmidt 2006; Davidson 2007; Román-Blas 2007; Spreafico 2009; Drengk 2009; Chien 2012); contiene FC que inhiben o neutralizan los efectos de citoquinas catabólicas, con lo que se preserva la integridad estructural (Bodo 1998; Scharstuhl 2002; Takahashi 2005; Vinyals 2012) y reduce el dolor al inhibir o neutralizar citoquinas proinflamatorias y sustancias que hipersensibilizan los nociceptores, estimular la síntesis del HA y en general por el reequilibrio homeostático (Oguchi 2004, Anítua 2007, Zavadil 2007; Gardner 2007).

1.4.1. Modelo animal, ensayos clínicos y tratamientos con PRP

Nuestro equipo investigador viene aplicando P-PRP desde el año 2000 tanto en el contexto de estudios en modelo animal o ensayos clínicos como en clínica rutinaria. Aplicamos la técnica descrita por Anítua, cambiando desde el inicio el sistema de aspiración con pipetas por agujas espinales que nos proporciona gran fiabilidad siempre que el personal manipulador esté convenientemente formado. En ocasión de diferentes ensayos clínicos con MSC expandidas, nuestro grupo de trabajo tuvo ocasión de estudiar el comportamiento del P-PRP como compactante de injertos óseos, biomateriales y “carrier” de MSC.

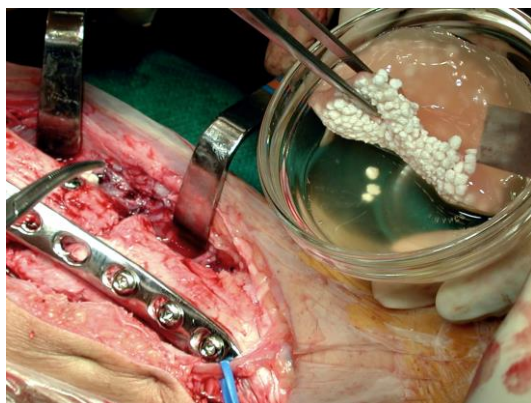


Fig. 20. Bioinjerto de MSC expandidas.

Se muestra el aspecto de la suspensión de MSC incluidas en gránulos de biomaterial de fosfato tricácico beta y el conjunto compactado con coágulo de PRP.

Presenta la consistencia adecuada para su aplicación en focos de defectos óseos no contenidos y evita pérdidas celulares inevitables por arrastre del sangrado.

citoquinas dirigidas hacia un perfil menos inflamatorio (Vinyals 2011).

En modelo animal equino se demostró la viabilidad, seguridad de uso e indicios eficacia antiinflamatoria del P-PRP en procesos articulares degenerativos (Carmona 2006).

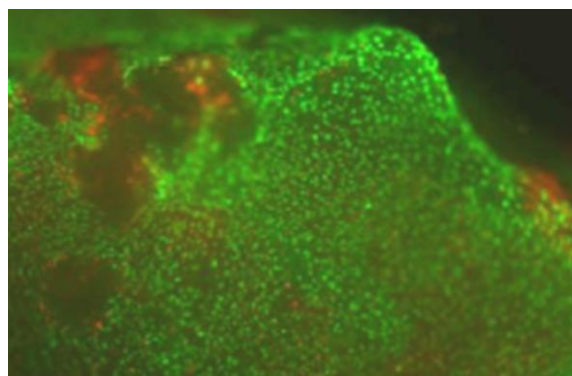
Es de especial interés el incremento significativo de la presencia de GAGs y disminución correlativa de los COMPs en suero tras la segunda infiltración de P-PRP aplicada en un intervalo de 15 días ya que es el intervalo que venimos aplicando. Estas variaciones las atribuimos al aumento de los procesos anabólicos y disminución de los procesos catabólicos (Abellanet 2009).

Fig. 21. Imagen de MSC de MO expandidas e incluidas en coágulo de PRP.

La imagen, obtenida por Aastrom Biosciencias a propósito del ensayo clínico del ITRT N^oEUDRA-CT: 2005-001755-38, demuestra que la viabilidad celular es adecuada en el coágulo de PRP al cabo de los 8 días de cultivo.

Desde un inicio, el comportamiento in vitro de MSC de casos sujetos a ensayo clínico nos confirmó la excelente viabilidad celular progenitora en el medio P-PRP, al tiempo que la compactación del bioinjerto que resulta tras la activación de la coagulación, ayuda al manejo, evita pérdidas celulares y permite afirmar la exactitud de la dosis celular aplicada. El posible efecto nocivo del coágulo de P-PRP sobre las MSC que algunos elucubran por su entramado hipóxico, no es tal ya que la pO₂ del nicho celular de las MSC en la médula ósea ya se encuentra en niveles del 5%. Además, se ha demostrado que la diferenciación de las MSC hacia un linaje condroblástico incluso mejora en condiciones de cultivo hipóxicas (Ranera 2012).

También se ha observado in vitro el efecto benéfico del P-PRP sobre condrocitos sometidos a estrés oxidativo y lipopolisacáridos (LPS), evidenciando el aumento de síntesis de GAGs, y la tendencia a la proliferación de condrocitos y



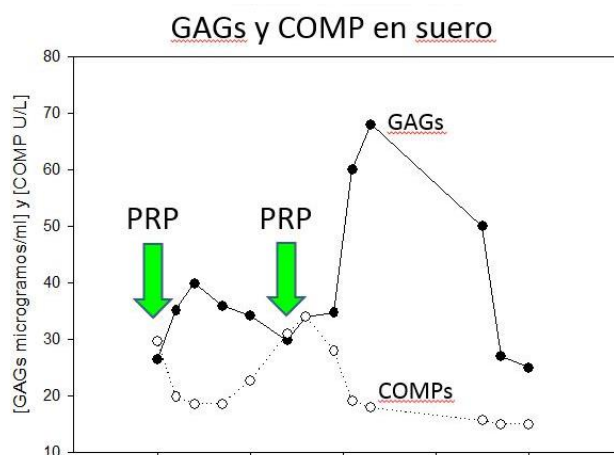


Fig. 22. Efecto del PRP en el tiempo. Efecto de una segunda dosis intrarticular de P-PRP sobre el contenidos de GAGs y COMPs en suero. Estudio en modelo equino (Abellonet 2009).

Destacamos la eficacia del P-PRP, especialmente resolutoria sobre derrames refractarios, que son constantes en la patología artrósica en la especie equina. Actualmente los tratamientos con P-PRP en el Hospital Clínico Veterinario de la UAB y en otros que en su día adaptaron nuestro protocolo, como el de la Universidad Nacional Autónoma de México (Dra. M. Masri - GF), las aplicaciones de PRP pueden considerarse rutinarias.

Otros estudios que realizamos en modelo porcino y canino referentes a utilización de P-PRP en interfase electrodo-miocardio de marcapasos epicárdico, reafirmaron la seguridad de uso y el efecto antifibrótico (Delclós 2007). También lo aplicamos en lesiones musculares y tendinosas con intención antiinflamatoria y pro regenerativa, efectos sobre los que interesa constatar prioritariamente evidencias de eficacia.

Con la participación del Centro Cochrane Iberoamericano, el BST y principales entidades deportivas catalanas, desarrollamos un ensayo fase III, randomizado, que incluyó 78 pacientes con lesiones musculares tipo "tennis leg". El resultado publicado en 2015 avala el efecto del tratamiento en cuanto a seguridad y clínicamente en cuanto a la disminución del dolor y recuperación funcional (Martinez Zapata 2015).

Respecto a la aplicación en la artrosis de rodilla ya durante los años 2002 a 2004 desarrollamos un ensayo clínico en fase I-II, unicéntrico, no aleatorizado, sometido al CEIC de Centro Médico Teknon. Incluyó 20 pacientes afectados de gonartrosis grado III y IV con clínica refractaria. 10 de los pacientes presentaban un índice EVA de 10; dos de ellos se encontraban literalmente incapacitados para la marcha. Se practicaron 4 infiltraciones de 8 mL de P-PRP con 15 días de intervalo entre ellas. No se observaron complicaciones, efectos adversos ni tóxicos.

Aplicando criterios OARSI y EULAR (Dougados 2000, Jordan 2003), al mes de finalizar el tratamiento se evidenció mejoría significativa en 71% de los pacientes ($p < 0.001$), aumentando la mejoría significativa hasta en el 85% de los pacientes a los 6 meses de haber finalizado el tratamiento ($P < 0.001$). Posteriormente continuamos el estudio linealmente hasta completar la serie de 87 pacientes tratados continuando los resultados con la misma tendencia estadística. La aplicación del P-PRP en práctica clínica habitual, a lo largo de más de 15 años, ha alcanzado un total de 10.000 infiltraciones articulares en más de 2500 pacientes sin haber registrado efectos adversos significativos, efectos tóxicos ni complicaciones.

Los buenos resultados obtenidos como antiinflamatorio nos motivaron a continuar la investigación en este campo (Orozco 2009). Sin embargo, hasta el momento, no habíamos evaluado un posible efecto regenerativo del PRP sobre el cartílago ya que lo considerábamos nulo.

1.4.2. Aspectos regulatorios de la terapia con PRP

La manipulación de productos hematológicos se rige por una legislación estricta. Nuestra pauta de actuación se adaptó desde el inicio de la experiencia a los dictados de:

- RD 411/1996 del 1 marzo 1996, emitido por el Ministerio de Sanidad y Consumo, el cual regula las actividades relativas a la utilización clínica de tejidos humanos.
- RD 1854/1993, de 22 octubre, que determina con carácter general los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y Bancos de Sangre.
- Directiva 2002/0128/CD del Parlamento Europeo y del Consejo, que establece las normas de calidad y seguridad para la donación, obtención, verificación, procesamiento, almacenamiento y distribución de células y tejidos humanos.
- Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 enero 2003, en la que establece las normas de calidad y seguridad para la recogida, control, tratamiento, almacenamiento y distribución de la sangre humana y sus componentes.
- Informe V1/23052013. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas.

Un informe de la AEMPS de 23 de mayo del 2013, establece el marco de uso del PRP en España, las obligaciones que deben respetar sus fabricantes y la información mínima que deben recibir los pacientes a quienes se les aplique.

Siendo considerado un «medicamento de uso humano», no medicamento de producción industrial ni de terapia avanzada, se enmarca entre los medicamentos elaborados de acuerdo con la prescripción de un facultativo reconocido que se destinan a un paciente individual bajo su responsabilidad personal directa.

En el caso de los métodos de obtención de PRP de forma manual con “técnica abierta”, el método empleado debe ser evaluado desde el punto de vista de calidad.

En nuestro caso el protocolo que incluye el tiempo de exposición al ambiente del PRP bajo atmósfera de flujo laminar, fue sometido por la dirección de nuestro centro a evaluación por la OCATT administración competente al respecto.

La cabina de flujo sigue las inspecciones periódicas reglamentadas. En los 100 primeros casos tratados se realizó hemocultivo sistemático de una fracción de la muestra inyectada. Posteriormente se realizaron hemocultivos en el 50% de los pacientes, hasta un total de 150. Actualmente se realiza hemocultivo de control en un caso de cada sesión de tratamientos. En un total de 250 muestras no se ha registrado ningún cultivo positivo (Soler 2011).

1.5. CÉLULAS MESENQUIMALES (MSC)

Las MSC son células derivadas del mesodermo que presentan pluripotencialidad de diferenciación ya que pueden originar linajes de células que conforman los tejidos derivados de esa misma capa como es el cartílago o de otras capas, como por ejemplo células hepáticas, tejido neurogénico o células pancreáticas (Dos Santos 2010, Chung 2010, Ranera 2012).

Estas células presentan la propiedad de autorrenovación aunque esta habilidad es finita y acaban por detener su crecimiento in vitro tras largos periodos en cultivo a diferencia de las células madre embrionarias (Zeng 2011).

Las MSC fueron descritas en 1970 por el equipo de Friedenstein. Descubrieron una población de células con morfología de fibroblasto y capacidad de formar colonias sobre la superficie de las placas de cultivo (Friedenstein 1970). Por este motivo, inicialmente fueron denominadas CFU-F; unidades formadoras de colonias de morfología fibroblástica. Posteriormente han recibido varios nombres: células estromales de la médula, células precursoras estromales o células madre mesenquimales. Para clarificar la nomenclatura de estas células, la «Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)» propuso aplicar el acrónimo «MSC» (*Mesenchymal stem/stromal cell*) para referirse a ellas (Horwitz 2005).

Las MSC no es una población celular uniforme, es una mezcla heterogénea de poblaciones. Como no existe un único marcador de superficie para su identificación positiva entre los otros tipos celulares de la médula ósea, es difícil definir con precisión las MSC. Por esta razón la ISCT definió en 2006 los requisitos que las células aisladas de médula ósea humanas deben cumplir para que puedan ser denominadas MSC (Dominici 2006):

1. Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo.
2. Expresión de determinados marcadores de superficie: más de un 95% de las células en cultivo deben mostrar en su superficie las moléculas CD90, CD105, CD73 (SH2 y SH3) y menos de un 2% de las mismas deben ser positivas en la detección de CD34 (marcador de células precursoras de células hematopoyéticas), CD45 (antígeno común de leucocitos), CD14 ó CD11b y CD79 α ó CD19 ó HLA-DR.
3. Multipotencialidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito. El inductor principal de la condrogénesis in vitro es el TGF- β . Tanto la isoforma TGF- β 1 como la TGF- β 3 son capaces de inducir la condrogénesis en MSC procedentes de médula ósea y tejido adiposo (Janderova 2003) aunque el potencial condrogénico aparenta ser mayor en las BM-MSc que en las AT-MSc cuestión para tener en consideración frente a futuras aproximaciones terapéuticas (Vidal 2008).

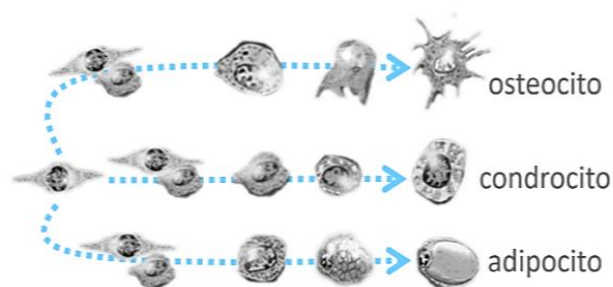


Fig. 23. Mesengénesis. Las MSC, sometidas a determinadas condiciones y medios de cultivo, se dividen asimétricamente y son capaces de generar linajes celulares diferentes dependiendo de estas condiciones. Por ejemplo, mediante cultivos con TGF- β , ácido ascórbico, dexametasona, BMP-6, BMP-7, IGF, FGF-2... se generan linajes condroblásticos; con ácido ascórbico, dexametasona, BMP-2 y 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ linajes óseos; con dexametasona, indometazina, IBMX, insulina y tiazolidona se generan linajes adiposos.

Por otra parte la AEMPS publicó directrices sobre la nomenclatura de las sustancias activas de los medicamentos de terapia avanzada que contengan células. El nombre de las sustancias activas de medicamentos de terapia celular se forma mediante el encadenamiento de como mínimo siete términos correspondientes a nueve atributos que en nuestro caso el producto utilizado son:

1. Células;
2. Mesenquimales;
3. Troncales;
4. Adultas;
5. Autólogas;
6. De médula ósea;
7. Expandidas;
8. Seleccionadas y cultivadas en el IBGM o Xcelia.

En esta Memoria seguiremos aplicando el acrónimo «MSC» entendido como una suspensión de MSC, digamos puras, obtenida mediante los procedimientos descritos de selección y cultivo.

Las MSC van demostrado ser una gran herramienta en la terapia celular debido a su potencial de diferenciación y capacidad de auto-renovación que permite la obtención de grandes cantidades de células que son necesarias para la aplicación terapéutica. La plasticidad que presentan a la hora de diferenciarse las hace idóneas para reparar y regenerar tejidos dañados, siendo sobretodo la habilidad de diferenciación a tipos celulares de tejidos conectivos lo que hace que las MSC sean las candidatas ideales para la terapia celular de enfermedades relacionadas con el sistema musculoesquelético.

Parece que la habilidad de regeneración de las MSC a través de la inserción-diferenciación en el tejido es secundaria, por lo que el principal sistema por el cual las células llevarían a cabo el proceso de regeneración sería modificando el microambiente del tejido a través de la secreción de factores solubles.

Factores bioactivos secretados por las MSC inhibirían la cicatrización y la apoptosis del tejido receptor y estimularían la mitosis de las células madre o progenitoras intrínsecas de este para regenerarlo. Esta actividad de secreción de factores por parte de las MSC se denomina actividad trófica (Caplan 2006, 2007).

Otro aspecto del mayor interés en la patología que tratamos es el potente efecto antiinflamatorio de las MSC consecuencia de los FC que liberan y su acción sobre los linfocitos T (Fibbe 2002, Le Blanc 2003; Tse 2003; Frank 2004; Aggarwal 2005; Rasmusson 2006; Nauta 2007; Le Blanc 2007).

Su potente acción inmuno-moduladora hace que estén siendo utilizadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) o la enfermedad de Crohn (Le Blanc 2003; Tse 2003; Frank 2004; Aggarwal 2005; Rasmusson 2006; Nauta 2007; Le Blanc 2007). Las MSC liberan factores de acción paracrina como exosomas que pueden reducir la fibrosis, la apoptosis y otros fenómenos como la formación de osteofitos asociados a la artrosis (Maumus 2013). Varios estudios han señalado el efecto de exosomas derivados de MSC en la mediación del efecto inmunomodulador de estas células (Yu 2014; Blazquez 2014).

Las MSC también presentan la propiedad de evitar el sistema inmunológico ya que el huésped genera pobre respuesta frente a ellas, lo que permite su trasplante de forma tanto autóloga como alogénica, incluso xenogénica (Le Blanc 2007, Ankrum 2014). El uso de células alogénicas ya nos ha mostrado su utilidad en casos de pacientes seropositivos a enfermedades transmisibles HIV o Lúes ya que en ellos no se admite el cultivo de células autólogas.

Las MSC no muestran un epigenoma tumoral, por ellas mismas no inducen tumores ni pueden transformar las células adyacentes. Se admite que pueden tener cierto riesgo de tumorigénesis debido a una transformación neoplásica de las propias células (Berdasco 2011, 2012).

Las células humanas son resistentes a transformarse ya que tienen mecanismos para controlar su ciclo de vida, no muestran un epigenoma tumoral. Sin embargo MSC adultas cultivadas in vitro por muy largos períodos de tiempo, entre 4 a 5 meses, entran en un período de senescencia, seguida de una fase de post-senescencia y finalmente en una fase de crisis. Estas células, inyectadas en ratones inmunodeficientes, condujeron a la formación de tumores, por lo que se demostró que un cultivo de MSC durante un largo periodo de tiempo conlleva un riesgo de transformación maligna (Rubio 2008). Esta situación no se da en terapia celular.

1.5.1. Selección y cultivo de MSC

La proporción de MSC en la médula ósea es muy baja respecto del total de células nucleadas y disminuye a medida de que avanza la edad del individuo (Dominici 2006). En humanos adultos la proporción de células varía desde 10.000/100.000 (MSC/MNC).

Si se aplican MSC con intención terapéutica debe disponerse una cantidad (dosis) elevada. Para lograr su expansión sin diferenciación se utilizan medios de cultivo que aportan el pH y los aminoácidos adecuados y necesarios para la supervivencia y el crecimiento más una combinación de antibióticos y FBS. Pero estos medios distan de la natural composición heterogénea de nutrientes y factores que disponen sin discontinuidad cuando están en sus nichos medulares.

Para intentar paliar este hecho, los medios de crecimiento están suplementados, habitualmente, con suero fetal bovino (FBS), rico en factores de crecimiento, nutrientes, hormonas y vitaminas. Sin embargo existe una elevada variabilidad entre los diferentes lotes comerciales aspecto que puede alterar el patrón de crecimiento de las células y los perfiles de expresión de moléculas de adhesión, razón que obliga a una atención personalizada de los responsables del procedimiento.

El crecimiento de las MSC *ex vivo* es altamente artificial; el crecimiento en una superficie bidimensional conduce a las células a adoptar morfologías distintas a las que normalmente presentan, por ello, el mayor reto en el cultivo de las MSC es el desarrollo de sistemas óptimos para la expansión efectiva y que alteren menos sus propiedades.

Habitualmente, los incubadores utilizan el aire atmosférico como fuente de oxígeno y las células crecen en un ambiente con porcentaje de oxígeno de entorno al 20%. Sin embargo, el ambiente que rodea a las MSC cuando están en sus nichos es bastante más bajo, encontrándose entre 1 y 7% en la médula ósea (Harrison 2002). Esta condición hipóxica no afecta el crecimiento de las MSC, incluso puede favorecerlo, tanto más si se pretende la inducción de linajes condroblásticos (Zscharnack 2009; Markway 2010).

La formación del cartílago durante el desarrollo embrionario tiene lugar en condiciones de hipoxia (Haselgrove 1993) y el cartílago adulto es un tejido pobremente vascularizado que presenta una presión de oxígeno cercana al 1% de O₂, lo que sugiere que un ambiente de hipoxia favorecería la diferenciación de las MSC hacia un fenotipo condrogénico (Grimshaw 2000).

1.5.2. Estudios en modelo animal

Diversas publicaciones hacen referencia a estudios en modelo animal con el objetivo de evaluar la eficacia del aporte de MSC en la regeneración de cartílago articular.

Nuestros estudios preliminares fundamentaron en la presencia fisiológica de MSC en la zona de cartílago hialino (Archer 2002) y su capacidad para reparar cartílago fibrilante (Kavalkovich 2000).

Otros estudios también habían determinado la eficacia del trasplante de MSC en defectos condíleos parcheados a modo de la técnica habitual del trasplante de condrocitos.

En modelo caprino condropatías provocadas de cóndilo femoral, asociadas a resección casi completa del menisco interno y del ligamento cruzado anterior (LCA), se emplearon para evaluar el efecto de la infusión intrarticular de 10x10⁶ MSC, autólogas, sometidas a inducción condrogénica y suspendidas en hyalurán sódico frente al control de suspensión aislada. Los casos tratados con MSC mostraron evidencia de una marcada regeneración meniscal. La degeneración cartilaginosa, aparición de osteofitos y esclerosis subcondral se desarrolló en mucho mayor grado en los casos control respecto a los tratados con MSC.

En un experimento separado los mismos autores habían comprobado la supervivencia y adherencia de las MSC infundidas. Las MSC mostraron mayor apetencia a implantarse en membrana sinovial, paquete adiposo y en el menisco lateral (Murphy 2003).

En modelo murino, se evaluó el efecto de MSC infundidas en lesiones provocadas. En todas las rodillas lesionadas se determinó la implantación espontánea de las MSC en el lugar de la lesión meniscal, cartilaginosa y LCA y la creación de nueva matriz extracelular con colágeno tipo II. Los resultados mostraron una dosis dependencia ya que la efectividad fue determinada a dosis 1×10^7 siendo negativa a dosis 1×10^6 (Agung 2006).

También se evaluó el efecto de MSC infundidas en articulaciones a las que se había provocado una lesión del cóndilo.

El grupo tratado mostró una clara tendencia a la regeneración frente a los grupos control ($p < 0.05$) aunque el tejido de nueva formación no presentó una estructuración hialina perfecta (Nishimori 2006).

En definitiva, la generalidad de la bibliografía reciente referente a las posibilidades regenerativas del cartílago, determina la eficacia de las MSC autólogas trasplantadas en modelos de estudio animal y nos alentó a seguir explorando este potencial regenerativo.

Nuestro grupo investigador también ha realizado distintos estudios preliminares en modelo animal equino y ovino constatando la viabilidad, seguridad e indicios de eficacia del tratamiento mediante MSC procesadas en el Departamento de Ingeniería Química de la UAB en colaboración con la «Unidad de Terapias Avanzadas del Banc de Sang i Teixits» de Barcelona (BST).

En el ámbito del Hospital Clínico Veterinario de la UAB, tras la autorización pertinente del CEEAH y siguiendo los criterios de BPL, se seleccionaron 3 equinos a los que se practicó una lesión condral en los cóndilos femorales seguido de infusión articular de hasta 50×10^6 MSC. Cuando existen lesiones condrales, al contrario de lo que sucede en clínica humana, es habitual en la especie equina la presencia de derrame sinovial refractario a cualquier tratamiento y por tanto es un buen modelo para observar el comportamiento ante una nueva terapia.

Se efectuaron controles clínicos intensivos, estudio de la marcha registrado en video, análisis de sangre, estudios de imagen radiográficos, ecográficos y de RNM tanto pre como post mortem. Tras la eutanasia a los 6 meses, se efectuaron los estudios histopatológicos y necropsia completa. No se registraron efectos adversos durante el tiempo de control. Las exploraciones de imagen y analíticas no detectaron alteraciones significativas sobreañadidas ni detectaron alteraciones sistémicas en el estudio necrópsico.

Consideramos del mayor interés la rápida evolución hacia la resolución de la inflamación articular de las articulaciones tratadas frente a sus controles que mantuvieron en el tiempo una inflamación articular muy aparente.

En otro estudio en modelo ovino, promocionado por el BST, evaluamos el efecto de dosis de 25×10^6 MSV sobre lesiones provocadas en cóndilos femorales y borde libre meniscal.

Los resultados a los 7 meses demostraron regeneración íntegra de las lesiones meniscales y consecución de cartílago de características hialinas en las lesiones del cóndilo femoral, frente los controles en los que no se evidenciaron cambios significativos (Vives 2010).

Con independencia de los estudios histológicos, el departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la UAB efectuó necropsia completa de los animales de experimentación evidenciando la ausencia de afectación de los distintos órganos.

Estos estudios se aportaron como criterios de seguridad en la documentación preceptiva previa al desarrollo de los ensayos clínicos.

1.5.3. Ensayos clínicos y tratamientos sucesivos con MSC

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado diferentes estudios con objetivo de valorar el potencial regenerativo de las MSC.

Además de ensayos orientados a la regeneración ósea maxilar en casos de edentulismo y de huesos largos en casos de pseudoartrosis refractarias, sustentados por los resultados obtenidos en modelo animal, se han realizado ensayos clínicos, sobre patologías que incluyen la desestructuración de cartílago como es el caso de la discopatía lumbar degenerativa y de la gonartrosis. Ante esta segunda patología se han desarrollado diferentes ensayos clínicos.

A partir de MSC de médula ósea autóloga

- N° EUDRA-CT:2009-017405 / Registro en Clinical Trials:NCT01183728
- N° EUDRA-CT:2009-016449 / Registro en Clinical Trials: NCT01227694

A partir de médula ósea alogénica

- N° EUDRA-CT:2011-005321-51 / Registro en Clinical Trials: NCT01586312

A partir de MSC autólogas criopreservadas

- N°EUDRA-CT:2012-004441-32

En todos estos ensayos clínicos se han determinado indicios de eficacia y ningún efecto tóxico o adverso significativo lo que ha justificado e incentivado la continuación de tratamientos en el ámbito del «uso compasivo», efectuados previa autorización y sometidos al control periódico por parte de la AEMPS.

Los resultados obtenidos en los mismos han sido publicados y se adjuntan a esta Memoria.

1.5.4. Aspectos regulatorios de la Terapia Celular

«Terapia Celular», «Ingeniería Tisular» y «Terapia Génica» son las llamadas Terapias Avanzadas cuya aplicación queda estrictamente regulada por la Unión Europea.

El año 2004 se produjo un cambio crucial en el manejo de estas terapias ya que se promulgó el Real Decreto (RD 223/2004) que confirió la categoría de «medicamento» a los productos celulares progenitores utilizados en terapia humana y que por tanto obliga a que los procedimientos de laboratorio de selección y cultivo celular, liberación y transporte de los productos celulares, sigan las Normas de Correcta Fabricación (NCF) exigidas a los productos farmacéuticos y a que la investigación pre clínica y clínica siga cánones que se exige a los mismos.

Respecto a las normas de fabricación a lo largo del tiempo se fue incorporando nueva reglamentación: Ley 29/2006, RD 1344/2007 y Ley 14/2007.

La aplicación terapéutica en sí también se enmarca de forma muy estricta. Debe pasar por ensayos clínicos siguiendo la reglamentación marcada por la normativa RD 1301/2006; CE N°1394/2007; CE N°668/2009 y RD 1825/2009 y el reciente RD 477/2014 que tiene como objetivo regular los requisitos y garantías que deben cumplir los medicamentos de Terapia Avanzada de fabricación no industrial para obtener la correspondiente «Autorización de Uso» por la AEMPS, así como, establecer los requisitos de trazabilidad y farmacovigilancia de estos medicamentos una vez autorizados.

Para el paso a la fase de ensayo clínico, previa autorización y bajo control de la AEMPS, suele exigirse estudios en modelo animal que han de haberse realizado siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL): RD 2043/1994 y RD 1369/2000.

II. HIPÓTESIS

- La infiltración intrarticular de 8 mL de PRP, autólogo, de bajo contenido leucocitario, elaborado según protocolo del ITRT (P-PRP) y administrado en 4 actos con intervalos de 15 días, ejerce un efecto analgésico significativo en gonartrosis grado II - IV pero no ejerce un efecto regenerativo significativo sobre el cartílago articular.
- La infusión intrarticular de 40×10^6 MSC, obtenidas por aspirado de médula ósea autóloga, seleccionadas y cultivadas bajo Normas de Correcta Fabricación del IBGM y suspendidas en 8 mL de medio isotónico de Ringer Lactato, Albúmina Humana al 0,2% y Glucosa 5mM, ejerce un efecto regenerativo sobre el cartílago articular en gonartrosis grado II-IV y un efecto analgésico significativo superior al obtenible mediante tratamiento con P-PRP aplicado según protocolo del ITRT.

III. OBJETIVOS

- Comparar la eficacia en términos de mejoría clínica en gonartrosis grado II - IV, tras la infusión intrarticular de 40×10^6 MSC de médula ósea autóloga, seleccionadas y expandidas bajo Normas de Correcta Fabricación del IBGM, respecto a la infiltración intrarticular de 4 dosis de 8 mL de P-PRP, preparado según protocolo del ITRT y administradas con 15 días de intervalo.
La evaluación se efectuará con cuestionarios algofuncionales EVA, Índice Lequesne y cuestionario WOMAC.
- Comparar la eficacia regenerativa en gonartrosis grado II - IV, tras la infusión intrarticular de 40×10^6 MSC de médula ósea autóloga, seleccionadas y expandidas bajo Normas de Correcta Fabricación del IBGM, respecto a la infiltración intrarticular de 4 dosis de 8 mL de P-PRP, preparado según protocolo del ITRT y administradas con 15 días de intervalo.

Se evaluará mediante el análisis de los valores T2 globales y patológicos, análisis de la Desviación Estándar (DE), análisis de los valores T2 zonales y análisis de los valores T2 por compartimentos de la articulación de la rodilla.

IV. MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de cohortes, prospectivo, con grupo de comparación y seguimiento de un año. Comparativo de los resultados de eficacia del tratamiento de gonartrosis grado II, III y IV de Kellgren y Lawrence en dos grupos de pacientes:

A) Grupo con tratamiento iniciado en Julio de 2010, tratado con MSV*.

B) Grupo con tratamiento iniciado en Febrero de 2011, tratado con P-PRP**.

**P-PRP autólogo, de bajo contenido leucocitario.

*MSV es una mezcla de MSC de médula ósea autóloga, procesadas según NCF del IBGM (Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid - Universidad de Valladolid y CSIC), resuspendidas en medio isotónico de Ringer Lactato + Albúmina Humana al 0,2% + Glucosa 5mM.

En ambos grupos, la estadificación clínica incluye la realización de las siguientes pruebas:

- Radiografías
- RMN T2 mapping Cartigram®
- Exploración física de la rodilla

Este estudio ha sido aprobado por el CEIC de Centro Médico Teknon. Todos los datos se mantienen en el anonimato y no se han relacionado con información que identifique a los pacientes.

4.1.1. Grupos de pacientes

Se evaluaron los datos obtenidos de 12 pacientes afectos de gonartrosis grados II, III y IV de Kellgren y Lawrence, con dolor refractario a los tratamientos habituales, tratados mediante infusión intrarticular de MSC de médula ósea autóloga, expandidas bajo NCF (grupo MSC; n=12), efectuando un estudio comparativo con los datos obtenidos de 12 pacientes tratados mediante 4 infiltraciones de PRP efectuadas con intervalo de 15 días (grupo PRP; n=12). Los pacientes fueron evaluados clínicamente y por estudios previos de imagen (Rx y RMN).

A los considerados incluíbles se les suministró la información relativa al estudio y la «Hoja de Información al Paciente», citándolos para la «Visita de Inclusión».

Todos los pacientes firmaron el «Consentimiento Informado» sobre el procedimiento concreto, conocedores de sus ventajas y posibles complicaciones.

Grupo MSC

Se parte de los datos obtenidos de sujetos incluidos en el ensayo clínico con N^o Eudra-CT 2009-017405-11 y tratamientos de uso compasivo sucesivos realizados previa autorización y bajo control de la AEMPS. Presentaban gonartrosis de grado II, III ó IV, tratados mediante infusión intrarticular de 40x10E6 MSC de MO autóloga suspendidas en 8 mL.

El tratamiento consistió en dos procedimientos quirúrgicos no invasivos y de muy baja morbilidad: obtención de 100 mL de aspirado de médula ósea de ambas crestas ilíacas posteriores, bajo sedación y anestesia local y al cabo de 23 días la infusión articular del producto celular, acto que no precisó anestesia. La obtención de médula ósea precisó un ingreso en régimen ambulatorio de 1 hora cumpliendo criterios de seguridad.

Grupo PRP

Paralelamente se reclutaron 12 pacientes para el grupo de tratamiento comparativo con PRP que cumplieron los mismos criterios de inclusión y exclusión que el grupo de MSC.

El procedimiento efectuado es el descrito anteriormente que implicó la obtención de 40 mL de sangre del propio paciente por venopunción y mediante centrifugado, por gradiente de densidad, se logró la separación de los distintos componentes de la sangre: hematíes, leucocitos y plasma.

La fracción que se utilizó es el PRP aleucocitario, en promedio unas dos veces más rico en plaquetas que la sangre periférica, según validación efectuada por el BST.

Se evaluó el efecto obtenido tras haber aplicado un total de 4 infiltraciones de 8 mL de PRP con periodicidad quincenal.

4.1.2. Criterios de Inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión

1. Gonartrosis grado II, III y IV de Kellgren y Lawrence valorada por dos observadores.
2. Rodilla dolorosa crónica de características mecánicas.
3. Ausencia de proceso séptico local o sistémico.
4. Análisis hematológicos y bioquímicos sin alteraciones que contraindiquen el tratamiento.
5. Consentimiento Informado por escrito del paciente.
6. El paciente es capaz de entender la naturaleza del estudio.

Criterios de exclusión

1. Paciente < 18 años, o legalmente dependiente.
2. Paciente > 75 años.
3. Infección presente (para incluirse en el estudio no debe evidenciarse ningún signo infeccioso).
4. Pacientes que presenten serología positiva (HIV 1 y 2, Hepatitis B [HBsAg, Anti-HBV-Ab], Hepatitis C [Anti-HCV-Ab] y Lúes).
5. Enfermedades congénitas o evolutivas que traduzcan malformación y/o deformaciones significativas de la rodilla, que dificulten la aplicación o evaluación de los resultados.
6. Sobrecarga ponderal expresada en índice de masa corporal (IMC) superior a 30,5 (obesidad grado II). Siendo $IMC = \text{masa (Kg)} : (\text{altura (m)})^2$.
7. Mujeres embarazadas o que pretendan estarlo o en periodo de lactancia.
8. Enfermedad neoplásica.
9. Estados inmunodepresivos.
10. Participación simultánea en otro ensayo clínico o tratamiento con otro producto en fase de investigación en los 30 días previos a la inclusión en el estudio.
11. Otras patologías o circunstancias que comprometan la participación en el estudio según criterio médico.

4.1.3. Diagrama de Flujo de Reclutamiento

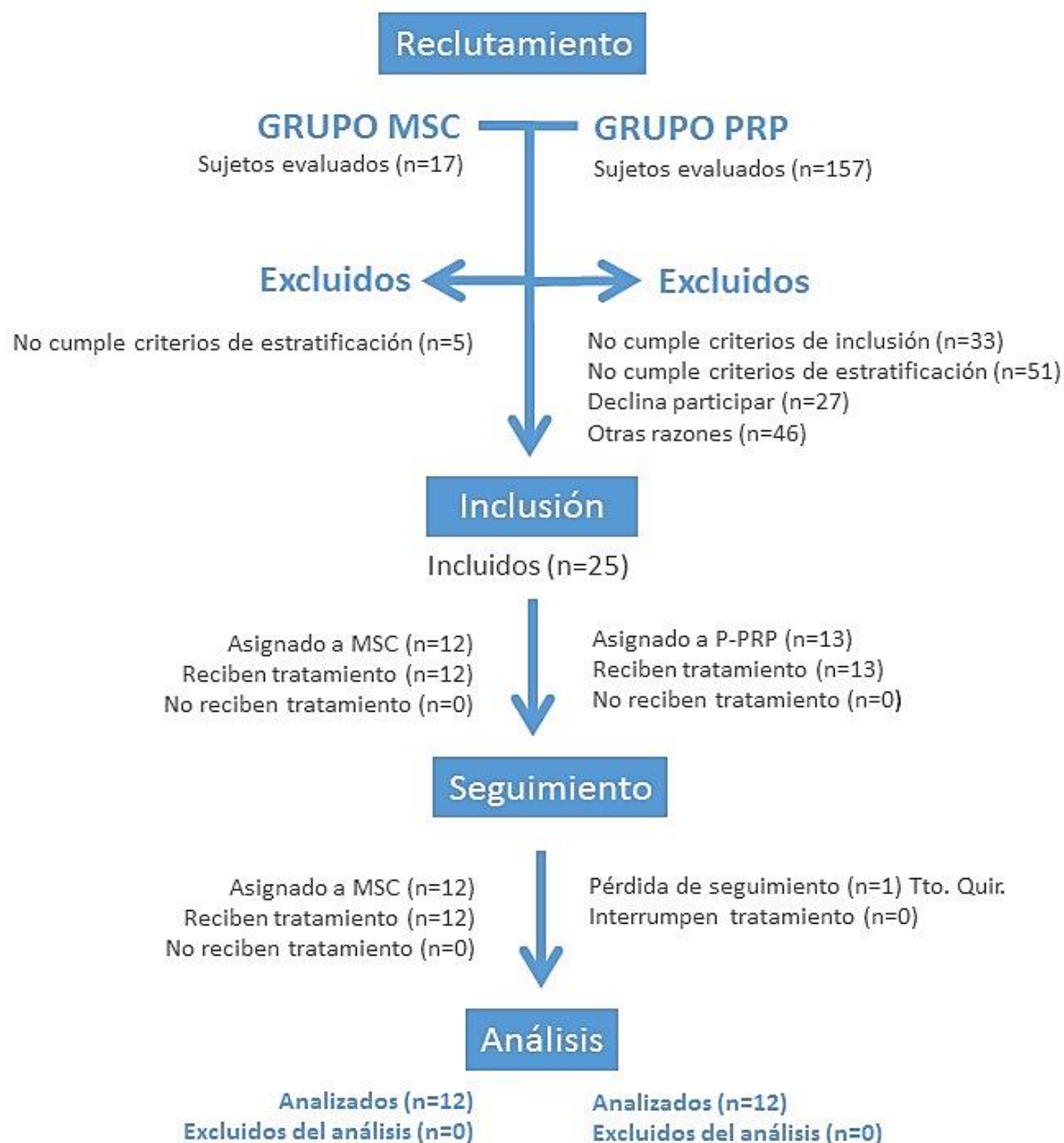


Fig. 24. Diagrama de Flujo

4.1.4. Programa de Seguimiento

GRUPO MSC	Pre. I	Inclu.	MO	MSC	8 días	3m	6m	12m
Historia Clínica Exploración Física	X				control X	control X	control X	control X
Rx	X							
RNM	X							
RNM cuantitativa		X						X
Analítica Preop RxTórax -ECG		X						
Hoja información	X							
Consentimiento Informado		firma X						
Womac, Lequesne, EVA		X				X	X	X

Tabla 7. Cronograma de seguimiento del grupo MSC

GRUPO PRP	Pre I.	incl	1º inf	2º inf	3º inf	4º inf	3m	6m	12m
Historia Clínica Exploración Física	X						control X	control X	control X
Rx	X								
RNM	X								
RNM cuantitativa		X							X
Hoja información	X								
Consentimiento Informado		firma X							
Womac, Lequesne, EVA		X					X	X	X

Tabla 8. Cronograma de seguimiento del grupo PRP

4.1.5. Criterios de retirada de los pacientes

Los pacientes pudieron abandonar el estudio en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y pudieron ser retirados del estudio por los siguientes motivos:

1. Presentar acontecimientos adversos que afectasen a su participación.
2. No desear continuar por cualquier motivo.
3. Violación del protocolo o desviación significativa de los procedimientos.
4. Pérdida de seguimiento.
5. Aparición de una enfermedad intercurrente clínicamente significativa que afectara a la participación en el estudio.
6. El investigador considerara beneficioso para el paciente retirarlo del estudio.

La retirada del paciente del estudio no hubiera representado ningún tipo de perjuicio para el paciente en el control de su enfermedad, en tratamientos posteriores o en el trato recibido por el equipo médico.

4.1.6. Criterios de reemplazamiento de los pacientes

El objetivo del estudio fue obtener 12 pacientes evaluables por grupo. Un paciente se consideró evaluable si le fue administrada en la rodilla 1 dosis de MSV ó 4 dosis de PRP.

En el caso de que a un paciente incluido no le hubiera sido aplicada la dosis correspondiente, se debía incluir a otro paciente hasta conseguir 12 pacientes tratados.

En este estudio se reemplazó 1 paciente del grupo PRP que decidió acceder al tratamiento quirúrgico de sustitución protésica.

4.1.7. Registro de Acontecimientos Adversos

Acontecimiento adverso (AA) es cualquier acontecimiento médico desfavorable que se presenta en un paciente o sujeto sometido a investigación clínica al que se administra un producto farmacéutico, independientemente que se considere o no relacionado con el producto farmacéutico.

Cualquier signo, incluyendo la alteración analítica, síntoma o enfermedad, desfavorables y no intencionados, que se presenten asociados temporalmente con el uso de un producto medicinal puede considerarse AA.

Los AA inesperados son aquellas experiencias no descritas -en naturaleza, gravedad o frecuencia- en la ficha técnica del producto.

Las experiencias clínicas preliminares con MSC o PRP no han identificado ningún AA significativo en la salud o seguridad asociado a su aplicación.

Los posibles riesgos relacionados con la sedación combinada con anestesia local necesaria para la aspiración de médula ósea que se habían considerado son: hipoxemia, paro respiratorio, neumonía por aspiración, hipotensión y muerte.

Sin embargo la probabilidad de una complicación de esta gravedad se hubiera considerado excepcional, especialmente en aspirados medulares de escaso volumen como los casos tratados.

Los posibles riesgos relacionados con la aspiración de médula ósea que se consideraron posibles son:

- Mínimo sangrado en el punto de punción; complicación sin importancia, que únicamente requiere realizar un vendaje compresivo.
- Sensación de náusea e inestabilidad en las horas que siguen a la sedación. Por dicho motivo se suele mantener ingresado al paciente durante 1 a 2 horas siguientes a la obtención.
- La reacción alérgica a alguno de los medicamentos anestésicos empleados se considera una complicación excepcional, con una incidencia inferior a 1 por 50.000 anestесias.
- Fiebre, en ocasiones unas décimas en las primeras horas post obtención.
- Dolorimiento en las zonas de punción que se controla rápidamente con analgésicos comunes, y desaparece normalmente en menos de 48 horas. Para favorecer su resolución se recomienda realizar unos días de reposo relativo.
- Infección local en los puntos de extracción.

Entre los posibles riesgos de la infusión celular o infiltración de PRP, tal como se ha comentado, sólo se ha considerado el riesgo de complicación séptica.

Se conocen casos graves de infección articular tras la administración de PRP que son atribuibles a la práctica de la preparación del producto defectuosa pero no al producto PRP en sí.

El riesgo es pues muy limitado al ser métodos no invasivos, percutáneos, realizados en ambiente quirúrgico y siguiendo normas de asepsia estrictamente protocolizadas.

Sólo cabe decir que se especula sobre si el potente efecto inmunomodulador que presentan las MSC puede facilitar la proliferación de gérmenes oportunistas.

No obstante se entiende que el tratamiento propuesto en este estudio supone riesgos inferiores a los de cualquier cirugía habitual de la patología contemplada.

La sedación y anestesia local se asume que mantienen niveles de riesgo muy bajos en condiciones de buena práctica clínica.

En el caso de haberse producido algún AA la recogida de los datos hubiera sido llevada a cabo por el equipo investigador describiéndolo según su:

- Duración
- Intensidad: Leve, Moderada o Severa.
- Frecuencia: Puntual, Recurrente o Persistente.
- Relación de Causalidad entre el tratamiento y AA:
No relacionada, Improbable, Posible, Probable o Cierta

4.2. ASPECTOS ÉTICOS

4.2.1. Requisitos éticos y reguladores

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo, los principios éticos basados en la última versión vigente de la Declaración de Helsinki (WORLD MEDICAL ASSOCIATION DECLARATION OF HELSINKI. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000 and Note of Clarification on Paragraph 29 added by the WMA General Assembly, Washington 2002) (7), en la Directriz ICH sobre Buena Práctica Clínica (ICH Topic E: Good Clinical Practice. Note for Guidance on Good Clinical Practice. CPMP/ICH/135/95 (8) así como a la legislación nacional y/o internacional aplicables.

4.2.2. Responsabilidades del Investigador

La doctoranda realizó el estudio de acuerdo las instrucciones y procedimientos descritos en el protocolo, permitiendo que los representantes del Departamento de Garantía de Calidad Clínica (CQA) y las Autoridades Sanitarias tengan acceso a todos los datos y registros relevantes.

La doctoranda fue responsable de que se proporcionara a los pacientes y/o a sus representantes legales la información oral y escrita adecuada sobre el estudio. Todas las cuestiones sobre el estudio se respondieron al paciente y/o a sus representantes legales.

4.2.3. Consentimiento Informado

Los pacientes elegibles sólo fueron incluidos en el estudio después de proporcionar por escrito el consentimiento informado. El consentimiento informado fue firmado y fechado por el paciente y el investigador, el cual había proporcionado a cada paciente (o un representante de éste) antes de su inclusión en el estudio, información completa y adecuada verbal y escrita de los objetivos y procedimientos del estudio, así como los posibles riesgos que pudiera comportar.

El consentimiento informado se obtuvo antes de iniciar cualquier procedimiento específico del estudio (es decir, todos los procedimientos descritos en el protocolo). El proceso de obtención del consentimiento informado se registró en los documentos fuente del paciente.

4.2.4. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)

Según la legislación nacional vigente, el estudio obtuvo la aprobación escrita del protocolo, del consentimiento informado y la hoja de información al paciente por parte del CEIC de Centro Médico Teknon.

4.2.5. Acceso a los datos del paciente

La información médica del paciente obtenida por la realización de este estudio se considera confidencial y está prohibida su revelación a terceras partes. La confidencialidad del paciente está asegurada ya que se les identificó tan sólo por un código numérico del estudio asignado.

El investigador informó a los pacientes que su identidad se mantendrá estrictamente confidencial. Se garantizó al paciente el estricto cumplimiento de la Ley 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales y RD 1720/2007 de 21 de diciembre por el que se aprueba el reglamento de desarrollo de la misma.

Cuando procesó y trató los datos del paciente, tomó las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados.

El paciente pudo revocar el consentimiento informado para el tratamiento de sus datos personales, dirigiéndose al investigador.

Los datos generados como resultado del estudio están disponibles para ser inspeccionados a petición del CEIC o de las Autoridades Sanitarias.

La firma del CI por escrito significa que los pacientes aceptaron explícitamente que los datos del estudio podrán ser consultados por el investigador y su equipo y si se requiere por el CEIC y Autoridades Sanitarias.

4.2.6. Responsabilidades del investigador

La doctoranda cumplió los requisitos del protocolo y se responsabiliza de que la información sea exacta y veraz. Especialmente, se veló en todo momento por el mejor cuidado posible del paciente anteponiendo siempre su seguridad y bienestar.

4.2.7. Cuaderno de recogida de datos (CRD)

Todos los datos generados en la parte clínica de este estudio se transcribieron en los CRD. Todos los datos fueron transcritos. Cualquier corrección de los datos fue firmada, fechada y con el motivo de la modificación anotado.

Los CRD se completaron de forma periódica para mantener actualizados los datos y reflejar el estado del paciente en cada periodo del ensayo. La información recogida e introducida en el CRD se corresponde con la de los documentos fuente.

Los pacientes no se identificaron por el nombre en el CRD, se utilizó una identificación codificada que consiste en un número.

4.2.8. Datos originales

Los datos originales son los que proporcionan evidencia de la existencia del paciente y aseguran la integridad de los datos recogidos.

Todos los datos sobre la participación del paciente en el estudio y estado clínico durante el periodo del estudio fueron anotados/archivados en la historia clínica del paciente. Estos datos se definen como datos originales.

La información médica relevante para la evaluación de eficacia y de seguridad fue transcrita a los CRD específicamente diseñados para el estudio y también recogida en la historia clínica.

Los datos del CRD que proceden de documentos originales son consistentes con éstos.

4.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico ha sido realizado con el software: SAS v9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Las decisiones estadísticas se han realizado tomando como nivel de significación el valor 0,05.

4.3.1. Variables del Estudio

El objetivo es la evaluación de la eficacia mediante criterios clínicos y de imagen a los 12 meses de la implantación de MSC y PRP. La base de datos final contiene información sobre 24 pacientes, 12 para cada grupo de tratamiento.

Se registraron las siguientes variables:

- Datos personales de los pacientes (filiación, edad, Nº de historia clínica...).
- Antecedentes personales de interés: antecedentes de tratamiento como condroprotectores, tratamientos intrarticulares previos y sus características.
- Variables de eficacia clínica: EVA, Índice de Lequesne, WOMAC.
- Variables de eficacia regenerativa: RMN Cartigram.
- Durante el seguimiento se recogieron: el tiempo transcurrido entre controles, el estado del paciente y de la rodilla, recurrencias o derrames. También se registran los tratamientos concomitantes recibidos.

4.3.2. Variables de eficacia clínica

4.3.2.1. La Escala Visual Analógica (EVA) tiene el propósito de medir la intensidad del dolor en los pacientes y consiste en una línea horizontal de 100 mm en cuyos límites se encuentran las expresiones extremas. Cero (0) es la ausencia del síntoma a evaluar y diez (100) se considera la mayor intensidad posible.

La EVA se utilizó para medir tanto la evolución del dolor asociado a las actividades de la vida diaria como de la actividad deportiva en caso de practicarse.

La «*Osteoarthritis Research Society International (OARSI)*» propone unos criterios para evaluar la respuesta individual al tratamiento farmacológico utilizado en la artrosis que permiten determinar si un paciente responde a una determinada terapia.

Los criterios son distintos en función de si el paciente recibe un tratamiento oral o intrarticular.

Si el tratamiento es administrado por vía intrarticular, como es nuestro caso, se establece una reducción de la EVA del 40% para poder determinar una mejoría relativa y de por lo menos 30 unidades de la escala para determinar una mejoría absoluta (Pham 2003).

4.3.2.2. El Índice Algofuncional de Lequesne (Lequesne 1987) se diseñó para poder valorar la capacidad funcional y el dolor de los pacientes con artrosis de cadera y rodilla y que la herramienta fuera útil para ayudar en la toma de decisiones de tratamiento como sería la indicación de cirugía protésica. Forma parte de las escalas de evaluación más empleadas para medir la repercusión de una artrosis de rodilla.

El cuestionario es de fácil aplicación, consiste en 10 preguntas con referencia al dolor, la rigidez y la función. Las preguntas se formulan para saber el grado de dolor (5 preguntas), la distancia que puede ser recorrida por el paciente en un episodio de marcha (1 pregunta) y cómo afecta a las actividades de la vida diaria del paciente (4 preguntas).

Cada bloque puede tener una puntuación mínima de 0 y máxima de 8, la puntuación total está dentro del rango entre 0-24. En función de la misma se establece una escala de gravedad:

- 14 = extremadamente grave
- 11-13 = muy grave
- 8-10 = grave
- 5-7 = moderado
- 1-4 = leve

Según la experiencia de los expertos, puntuaciones a partir de 10-12 puntos apoyarían una posible opción de tipo protésico como tratamiento (Altman 2005).

4.3.2.3. El Cuestionario WOMAC fue diseñado en las universidades de Western Ontario y McMaster en 1988 para medir la sintomatología y la discapacidad física percibida por la población con artrosis de cadera o de rodilla. La adecuación de sus propiedades métricas se ha demostrado en multitud de investigaciones, especialmente su sensibilidad al cambio (McConnell 2001, Faucher 2004).

Este instrumento se ha utilizado ampliamente en estudios que evalúan la efectividad de la artroplastia total de rodilla (ATR).

Su adaptación al español se realizó en 1999 y se validó en 2002, siendo utilizada posteriormente en numerosos estudios del ámbito español (Batlle-Gualda 1999; Escobar 2002). A pesar de su extensión de 24 ítems, es el único instrumento específico que se ha adaptado en la población española con gonartrosis.

Análisis de homogeneidad basal

Para asegurar que los grupos de tratamiento fueran homogéneos en función de valores basales (EVA, WOMAC, Lequesne), posibles factores de riesgo u otras variables que pudieran influir en la respuesta, se realizaron análisis de homogeneidad basal bivariantes siguiendo el procedimiento detallado a continuación:

Variables cualitativas: se utilizó la prueba de homogeneidad de distribuciones discretas adecuada (test de Chi-cuadrado o test exacto de Fisher) en función del cumplimiento de los criterios de aplicación.

Variables cuantitativas: en primer lugar se analizó las condiciones de aplicación de las diferentes pruebas (pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk i pruebas de Homogeneidad de varianzas de Levene). Se aplicó el modelo lineal o no paramétrico adecuado en función del cumplimiento de los criterios de aplicación (T-test o test de Wilcoxon).

Análisis de los cuestionarios

Para cada cuestionario se realizaron los siguientes análisis:

- Resumen descriptivo: Se obtuvieron tablas resumen con los estadísticos: N, Número de datos faltantes (NMiss), Media, Mediana, Desviación estándar (Std Dev) y valores Mínimo y Máximo; para cada grupo de tratamiento y globalmente. Se han representado gráficamente mediante diagramas de caja.
- Modelización: Se ajustó un modelo de regresión lineal de medidas repetidas teniendo en cuenta el tiempo, el grupo de tratamiento y la interacción entre grupos y tiempo. Se obtuvieron las medias ajustadas con el IC del 95% para cada grupo y tiempo.

- Análisis entre grupos: Para cada tiempo se compararon las medias entre los dos tratamientos, obteniendo las medias de las diferencias encontradas con el intervalo de confianza del 95%.
- Análisis intra grupos: Para cada grupo de tratamiento se compararon las medias a lo largo del tiempo (0m, 6m y 12m para EVA y 0m y 12m para Lequesne y WOMAC). En caso de obtener un resultado significativo, se realizaron los contrastes 2 a 2 a posteriori corrigiendo los valores p con la corrección de Tukey. Se han obtenido las medias de las diferencias con el IC del 95%.

4.3.3. Variables de eficacia regenerativa

Se realizó el estudio mediante RMN T2 mapping Cartigram® en 88 zonas (ROI) de la rodilla. Los datos del estudio basal efectuado antes del tratamiento se confrontaron con los homólogos obtenidos al año de seguimiento.

Se crearon las variables indicadoras de valor bajo y valor patológico (sí/no), y se calculó para cada paciente el número de zonas con valor patológico y número de zonas con valor bajo (antes y después del tratamiento).

Las variables se recodificaron en tres categorías:

- Valor bajo (<30 ms)
- Valor normal (30-45 ms)
- Valor patológico (>45 ms)

Considerando variaciones significativas ya sea en sentido positivo como en sentido negativo las superiores al 7% del valor basal.

Análisis de los valores T2 de todas las ROI

Se obtuvieron tablas de contingencia con los resultados de las variables recodificadas antes y después del tratamiento (para las 88 ROI de los 12 pacientes de cada grupo de tratamiento).

Se han representado gráficamente a partir de un gráfico de barras agrupadas.

Estos gráficos también se han obtenido para cada uno de los pacientes por separado.

Se analizó el número de zonas con valores patológicos y el número de zonas con los valores bajos siguiendo el mismo procedimiento que en el análisis de cuestionarios.

Análisis de los valores T2 que consideramos patológicos (45-99 ms)

Se repitió el análisis anterior considerando solo los valores patológicos (45-99 ms).

Análisis de la DE de los valores T2

Se calculó la DE de los valores T2 a los 0 meses y a los 12 meses mediante paired t-test, obteniendo las medias de las diferencias encontradas con el intervalo de confianza del 95%.

Análisis de los ROI diferenciando compartimentos de carga

Análisis de las ROI del cóndilo femoral: CIM, CIIM, CIIL, CIL, CEM, CEIM, CEIL, CEL.

Análisis de las ROI del cóndilo tibial: TEM, TEIM, TEIL, TEL, TIM, TIIM, TIIL, TIL.

Se representaron gráficamente las medias de estas posiciones según el grupo, adaptadas al método de recogida de datos de varios estudios longitudinales para el estudio de la artrosis (Reichenbach 2009, Eckstein 2010).

Análisis de correlaciones

Análisis de correlación entre valores T2 y el índice WOMAC.

Análisis zonal

Debido al conocimiento generado por y durante el mismo estudio se consideró adecuado introducir un análisis no previsto en un inicio. Se realizaron 6 estudios zonales por cada grupo, escogiendo los 3 pacientes más jóvenes de cada grupo por disponer mayor grosor de cartílago y facilitar la discriminación del cartílago profundo y superficial a 1,5 T. De cada paciente, el radiólogo escogió 2 ROI que partiendo de valores T2 elevados hubieran mejorado significativamente el valor T2, acercándose a valores de cartílago hialino.

Lectura y validación de la Base de Datos

La lectura, gestión i validación de la base de datos se realizó con el software SAS v9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Se realizó una validación de la consistencia interna de las variables de la base de datos así como de los valores fuera de rango y valores faltantes para asegurar totalmente su fiabilidad. Una vez finalizado el proceso de validación la base de datos fue cerrada.

4.4. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DEL P-PRP

4.4.1. Material necesario

Sala

La terapia de infiltraciones con PRP se realiza en sala diseñada y dedicada a este fin, dotada con cabina de flujo laminar TELSTAR BIO II ADVANCE III que sigue las pautas de revisión reglamentadas, aire acondicionado controlado según estándares del Centro Médico Teknon. Agua corriente en lavadero. El suelo es de mosaico pulimentado y las paredes de material sintético. Sigue un mantenimiento de limpieza diario a cargo de personal contratado.

La mesa de exploración en donde se acomoda el paciente está separada del área correspondiente a la mesa de despacho mediante mampara de cristal opaco. La circulación a su alrededor es holgada y permite realizar exploraciones complementarias con comodidad.

Durante los tratamientos, en el interior de la sala solo se encuentran el paciente, la enfermera especializada en la técnica y el médico del equipo de ITRT, prohibiéndose el acceso a cualquier otra persona salvo situaciones especiales.

Instrumentos específicos

- Centrífuga marca JP SELECTA modelo MIXTGASEL, con 4 cabezales oscilantes de 4 tubos de 9 mL cada uno, validada por ITRT y ajustada por el fabricante.
- Cabina de aire laminar NUAIRE 201-230E.
(Los dispositivos siguen el mantenimiento dictado por las firmas suministradoras)

Material fungible

- Solución jabonosa Hibiscrub®
- Alcohol 70°
- Povidona Yodada en solución acuosa - Betadine®
- Clorhexidina - Hibitane® - en solución alcohólica
- Cepillos para lavado quirúrgico (estériles)

- Toallas de papel estériles
- Rasurador
- Gasas
- Mascarillas quirúrgicas
- Guantes de látex no estériles, Guantes de látex estériles
- Tallas estériles desechables
- Smarch
- Cánulas - sistema Venojet de Terumo®
- Émbolo protector
- Gradilla portatubos
- Tubos citratados estériles - citrato sódico al 3,8% de 10 CC (tapón azul)
- Tubos no citratados estériles (tapón blanco)
- Cloruro Cálcico - Braun® al 10%
- Jeringas estériles (20, 10, 5 cc)
- Aguja hipodérmicas (0.8x40 mm, 0.7x30mm, 0.5x16 mm)
- Aguja espinal 18 -Yale®
- Apósitos adhesivos estériles -Tiritas®
- Aguja de insulina

4.4.2. Proceso según orden cronológico

Preparación preliminar del personal y material

- Media hora antes de iniciar la sesión de tratamientos, con la sala vacía de personas, se realiza el encendido de la luz ultravioleta de la cabina de flujo laminar. Esta luz se cierra en el momento que se inicia la actividad.
- Enfermera quirúrgica vestida con pijama blanco de manga corta.
- Desinfección de superficies de la cabina de aire laminar con alcohol 70°
- Colocación de la mascarilla desechable.
- 1^{er} lavado de manos durante 5 minutos. Secado con papel estéril desechable.
- Guantes desechables (no estériles).
- Desinfección de los tapones de los tubos citratados (tapón azul) con gasas estériles impregnadas de povidona yodada.

Preparación preliminar del médico aplicador

- Vestuario: chaqueta quirúrgica blanca de manga corta.
- Comprobación de la disposición de datos indispensables previos al tratamiento: historia clínica, documento de consentimiento informado cumplimentado, hoja de registro de actividad...
- Colocación de mascarilla desechable.
- Preparación del paciente en decúbito supino.
- Brazo extendido apoyado en la mesa de exploración.
- Colocación de Smarch a unos 10 cm proximal al pliegue del codo.
- Antiseptia de la piel de la cara anterior del codo mediante Solución de Clorhexidina.

Obtención de muestra de sangre

Durante este proceso el médico ayuda a la enfermera en el manejo de los elementos no estériles manipulando mediante guante desechable no estéril.

- La enfermera punciona la vena antecubital con cánula Venojet de Terumo®.
- Recogida de la sangre extraída en tubos citratados de 10 cc (9 cc hábiles). Volumen extraído según necesidad.
- Al finalizar la extracción se comprime el punto de punción durante unos 2 minutos mediante gasa estéril.
- Aplicación de apósito en el punto de punción.
- Colocación de los tubos en los recipientes de la centrifuga según norma.

Centrifugación

- 1800 rpm durante 8 min.

Al finalizar el proceso de centrifugado, el médico coloca los tubos en la gradilla e inmediatamente dentro del ambiente de la cabina de flujo laminar.

- Extensión de talla verde estéril en superficie de la cabina de flujo laminar.
- Paquete de gasas pequeñas.
- Guantes estériles.
- Jeringa 10 cc.
- Aguja espinal 18 GA.
- Aguja de insulina.

Preparación de la enfermería quirúrgica para la obtención del PRP

- Lavado quirúrgico durante 3 minutos. Enjuagado y secado con toalla de papel estéril.
- Colocación de guantes estériles.

Preparación del PRP en ambiente de flujo laminar

- Abertura de los envoltorios de las jeringas.
- Abertura de todos los tubos situados en la gradilla (tapones azules y blancos) (desde este momento ya no se considera ninguna de las dos manos estériles).
- Aspiración con jeringa sin que ni la aguja ni la jeringa toquen en ningún momento las superficies externas de los tubos u otras consideradas no estériles. En caso de incidencia en este sentido se invalidaría todo el proceso, debiéndose valorar la conveniencia de su repetición en la misma sesión.
El contenido de plasma seleccionado se vierte en los tubos no citratados (Queda pendiente la activación de la coagulación del PRP con CaCl₂)

Preparación del médico para la infiltración

- Lavado de manos y antebrazos durante 5 minutos con jabón antiséptico y cepillo quirúrgico, 3 minutos en lavados sucesivos.
- Enjuagado y secado con toalla de papel estéril.
- Colocación de guantes estériles.

Preparación del paciente para la infiltración de PRP

El rasurado, si se precisa, se efectúa por el médico con anterioridad al proceso del lavado quirúrgico de manos.

En posición adecuada para la infiltración según región a tratar.

Abarcando amplia zona alrededor del punto de infiltración, antisepsia de la piel con alcohol de 70° impregnando torunda de gasa.

- Aplicación de povidona yodada impregnada en torunda.
- Segunda aplicación de povidona yodada con nueva torunda. En casos de manifiesta alergia al yodo se sustituye por solución de clorhexidina.
- Delimitación de la región con tallas estériles.

Aplicación del PRP

- La enfermera realiza la activación de la coagulación del plasma contenido en los tubos que se mantienen en la cabina de flujo laminar, con CaCl₂ - según dosis establecida para compensar la dosis de citrato sódico, usado como anticoagulante en la extracción de sangre. La ampolla de CaCl₂ se abre y la dosis adecuada es aspirada con jeringa y vertida en los tubos.
- El PRP activado se carga en jeringa de volumen adecuado a la cantidad mediante aguja espinal apoyada en el fondo del tubo. En caso necesario se purga el aire de la jeringa.
- Se retira la aguja espinal y se coloca la aguja seleccionada por el médico para la infiltración sin retirar el capuchón protector plástico.

(Todas estas acciones se realizan dentro del ambiente de la cabina de flujo)

- El médico de ITRT recibe la jeringa cargada con PRP y realiza la infiltración.
- Guarda un residuo que se vacía en tubos de laboratorio para práctica de cultivos bacterianos del producto infiltrado como control rutinario.
- Cubrir punto infiltrado con gasas estériles. Aplicación de alcohol y Tiritá®.

Recogida del material y residuos biológicos

- Se efectúa la limpieza de las superficies empleadas y eliminación de residuos como envoltorios del material empleado.
- Todo el material con contenido biológico y punzante se vierte en contenedor de residuos biológicos que sigue el protocolo de recogida. El resto: guantes, gasas, tallas... se vierte en recipiente adecuado que también sigue su proceso de recogida habitual.
- Se repite el proceso de desinfección de las superficies de la cabina.
- La enfermera quirúrgica cumplimenta y guarda la hoja con los ítems de control de calidad del proceso.

4.4.3. Validación del Procedimiento de Obtención de P-PRP

La caracterización del PRP utilizado es crucial para evaluar efectos de la terapia con PRP. La variabilidad en la composición es inherente al producto, pero es exigible establecer unos rangos aproximados, ya que distintos PRP pueden causar distintos efectos, incluso efectos contrapuestos.

Sistema de PRP	Plaquetas mm ³	Leucocitos mm ³
ITRT (BTI)	563 ± 200 x 10E3	300
Arthrex	378 ± 58 x 10E3	600±0.3
BIOMET	873 ± 207 x 10E3	20.000±6.7
Haemonetics (ITRT)	1.380 x 10E3	400

Tabla 9 . Contenido plaquetario / leucocitario de PRP obtenido con diferentes sistemas.

Fuente: Ensayo Clínico PRP-RICE <http://www.bloodtransfusion.it/articolosing.aspx?id=000755>

La Tabla 9 representa rangos aproximados de plaquetas y leucocitos obtenidos con diferentes sistemas. El ítem ITRT se refiere al sistema descrito por E. Anítua en el que modificamos el sistema de pipeteo procurando disminuir los riesgos de contaminación.

El sistema Haemonetics fue testado por nuestro equipo en ocasión de un ensayo clínico.

Nuestro procedimiento habitual es un sistema en tubo.

Siguiendo la normativa, el tiempo de la manipulación del producto se realiza bajo atmósfera de flujo laminar horizontal.

En los 100 primeros casos tratados se realizó hemocultivo sistemático de una muestra del producto infiltrado. Posteriormente se realizaron hemocultivos en el 50% de los pacientes hasta un total de 150.

Actualmente se realiza un hemocultivo en cada sesión de tratamientos. Han resultado negativos hasta la fecha (General Lab).

La validación del PRP fue efectuada por el BST mediante citometría de flujo. La aplicación de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas ofrece grandes ventajas sobre otros métodos de análisis, porque solo exige la disposición de pequeñas alícuotas de sangre, aproximadamente 2 μ L, y una manipulación mínima, evitando interferencias por activación in vitro y reduciendo las posibles pérdidas de subpoblaciones de plaquetas (Shattil 1987; Abrams 1991).

Es el único sistema hasta el momento que puede detectar subpoblaciones de plaquetas.

Los marcadores utilizados incluyen reactivos monoclonales dirigidos contra proteínas que se expresan en la membrana plaquetaria, tales como CD41 y CD61 (McKenzie 2001).

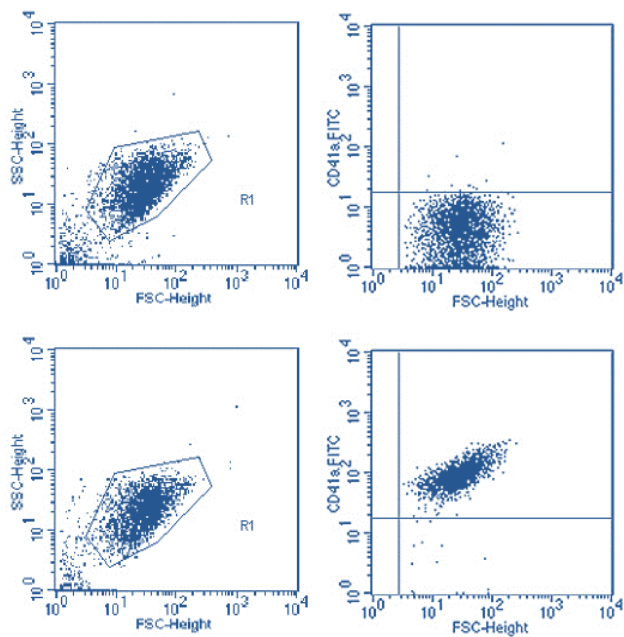


Fig. 25. Citometría de flujo PRP. Control negativo IgG y control positivo para plaquetas CD41a (CD41/CD61).

	sangre periférica (basal)		PRP	
	media	rango	media	rango
Plts x 10E3 μ L	228	165-329	563	407 - 801
Plts x 10E9	8.01	4.3 - 12	3.69	1.7 -7.2
Vol. mL	36	18 - 45	8	3 - 9
Plts recup. %	-	-	50	33- 66
Plts. incremento	-	-	2,5	1.5 - 3.4

Tabla 10. Concentración de plaquetas sangre-PRP. Evaluación sobre muestra lineal de 20 casos (Validación BST)

El tratamiento con PRP al que nos referimos en este estudio sobre gonartrosis, es un PRP autólogo preparado siguiendo el procedimiento del ITRT siguiendo estrictas medidas de asepsia.

El fraccionamiento de los diferentes componentes sanguíneos se efectúa en tubos citratados mediante centrifugación a 460 g con lo que se logra preservar la integridad plaquetaria y evitar la degranulación. Es decir, la liberación prematura del contenido de sus gránulos alfa, que supondría la exposición de los FC a la rápida acción desnaturalizadora de las proteasas presentes en el mismo plasma.

Se trata de un PRP que contiene algo más del doble de plaquetas que la sangre periférica y mínima presencia leucocitaria y por tanto poco o nada tiene que ver con FC recombinantes y sus

efectos. Tampoco presenta un exceso de TNF- α ni de interleukinas proinflamatorias, factor esencial para no alterar el balance antiinflamatorio de las citoquinas presentes.

Otras técnicas comercializadas de obtención de PRP son totalmente opuestas en este aspecto ya que aportan al PRP un concentrado leucocitario. Algunas implican centrifugados a altas «g», incluso centrifugados repetidos, efectuados mucho tiempo antes del acto quirúrgico. En estos casos se suman los efectos negativos de la degranulación plaquetaria no controlada y el excesivo tiempo transcurrido hasta la misma, lo que presupone una pérdida significativa de FC.

En nuestro caso la activación de la coagulación se realiza mediante adición de CaCl₂ a proporciones precisas (Anítua 2004). Otras técnicas consiguen la activación mediante trombina homóloga o heteróloga que, aparte de otras consideraciones, tiene alto poder antigénico y puede condicionar por sí misma un resultado negativo del tratamiento con PRP.

El PRP se administra inmediatamente después de su activación en un volumen máximo de 8 mL. El procedimiento se realiza 4 veces a intervalos de 15 días entre cada actuación.

Asumir estos conceptos es fundamental para la comprensión del tema y la interpretación de los resultados obtenidos; por esto la terminología empleada debe procurar clarificar al máximo el producto del que se está tratando.

En nuestro caso utilizamos el anagrama P-PRP siguiendo la clasificación de Ehrenfest basada en 2 parámetros: presencia/ausencia leucocitos y arquitectura fibrina (Ehrenfest 2014).

- P-PRP Plasma rico en plaquetas puro o pobre en leucocitos
- L-PRP Plasma rico en plaquetas y leucocitos
- P-PRF Fibrina rica en plaquetas y pobre en leucocitos
- L-PRF Fibrina rica en plaquetas y leucocitos

Muchos dispositivos comercializados para la obtención de este producto (Harvest Smart-Pre P de Harvest technologies, Plymouth, USA; Biomet GPS III de Biomet Inc, Warsaw, USA o Regen PRP de RegenLab, Lausanne, Suiza), obtienen el producto que se corresponde con el L-PRP. Su aplicación articular puede tener un efecto muy diferente al P-PRP porque puede inclinar la balanza a favor del componente proinflamatorio además de incrementar los niveles de moléculas catabólicas como IL-1 β y MMP (Sundman 2011). Es cierto que el P-PRP también es fuente de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL17 e IL-18) pero en mucha menor proporción que el L-PRP y el balance de la liberación de elementos anti-inflamatorios es absolutamente favorable. El P-PRP libera una proporción de IL-1 α 23.000 veces mayor que IL-1 α y 8000 veces mayor que IL-1 β (Xie 2014; Magalon 2014).

4.5. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DE LAS MSC

4.5.1. Obtención de médula ósea por punción-aspiración

La punción-aspiración de la médula ósea se realiza en quirófano en sesión programada. El paciente en decúbito prono, acomodado con almohadas, se somete a sedación suave. Seguidamente, se procede a pincelado del campo quirúrgico con solución de clorhexidina y delimitación con campos estériles dejando libres ambas crestas ilíacas posteriores.

Tras anestesia local y sedación, dos miembros del equipo de ITRT, situados a ambos lados de la mesa de operaciones, realizan diversas punciones óseas con trócar de 11 GA, bajo la espina ilíaca

posterossuperior en dirección a la articulación sacroilíaca -esta es la zona del ilíaco con mayor espesor trabecular-. La técnica implica la perforación cortical y aspiración súbita de 1-2mL de médula ósea para evitar en lo posible el aspirado de sangre periférica.

El producto obtenido se inyecta en la bolsa suministrada para el transporte que previamente ha sido heparinizada con dosis protocolizada según el volumen de aspirado medular. Las dos aspiraciones sucesivas se realizan rotando el trocar biselado 90°, en sentido de las agujas del reloj. El mismo orificio de punción permite profundizar 1-2 mm unas dos veces, repitiendo la misma metodología de aspiración de 1 mL, cambio de jeringa, rotación del bisel 90° y nueva aspiración. Luego el trocar puede retirarse ligeramente, deslizándolo unos pocos milímetros sobre la cortical de la pelvis y repetirse la punción, continuando en ambos lados de la pelvis hasta conseguir unos 100 mL.

Evitar que el proceso de obtención del material celular se dilate en el tiempo es crítico para evitar la contaminación de la muestra. El procesado celular se realiza sobre la muestra obtenida. Si la cantidad recolectada de células progenitoras es baja, la expansión dará un producto de capacidad biológica limitada.

Siguiendo los requisitos establecidos por la legislación, la muestra de aspirado de médula ósea se transporta a la Unidad de Terapia Celular del IBGM en Valladolid o Xcelia, Unidad de Terapias Avanzadas del BST en Barcelona.

El transporte se realiza en condiciones reglamentadas, en un máximo de 12 horas, en contenedor isoterma entre 4-12 °C.

4.5.2. Procesado Celular en la Unidad de Terapia Celular

El procesado y multiplicación de las células recolectadas de médula ósea siguiendo el procedimiento bajo NCF dura entre 21 y 23 días.

El equipo facultativo responsable es experto en el manejo del procedimiento de selección, cultivo y recogida del producto celular. Este producto, una vez disponible para aplicación, recibe el nombre de MSV en el caso de MSC procesadas en el IBGM y de Xcel-condro-alfa en el caso de MSC procesadas en el BST.

Los pormenores de los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) son específicos para cada unidad de producción y en algunos aspectos se encuentran bajo protección de la propiedad intelectual, razón por la que no se describe con detalle, sin embargo, en lo fundamental, los procedimientos son equiparables y el producto final se considera que posee las mismas propiedades fundamentales.

El procesamiento de la médula ósea se inicia antes de que transcurran 12 horas desde la realización del aspirado y dura aproximadamente unos 23 días.

En una etapa inicial se selecciona la fracción celular mononuclear mediante gradiente de densidad con Ficoll. Posteriormente, se lleva a cabo un estudio de viabilidad celular utilizando el colorante Trypan-Blue, puesto que para iniciar el cultivo es necesario que las células mononucleadas (CMN) presenten una viabilidad igual o superior a 70%. Una vez comprobado el buen estado de las CMN, se siembran en frascos de cultivo y se incuban, cambiando el medio cada 3-4 días. Periódicamente se valora microscópicamente el aspecto de la monocapa celular que forman las MSC y cuando se alcanza el 60-80% de la superficie de la placa de cultivo, se procede a su tripsinización y subcultivo con el fin de aumentar y purificar la estirpe celular. Se realizan como máximo tres pases o procesos de tripsinización.

En la mañana del día 21-23 cultivo, que es el mismo día en que se realiza la infusión celular, las MSC se resuspenden en 8 mL de medio isotónico de Ringer Lactato, Albúmina Humana 0,2% y Glucosa 5mM con una concentración de $40 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$ MSV, contenida en jeringa o bolsa,

asegurando una viabilidad celular $\geq 80\%$.

La caracterización de las MSC se realiza mediante estudios inmunofenotípicos utilizando citometría de flujo (típicamente expresión de CD73, CD105, CD90, D166 y negatividad de CD45, CD14, CD34, CD31, HLA-DR).

Todo el proceso de producción se lleva a cabo por especialistas altamente cualificados en cultivos celulares cumpliendo Normas de Correcta Fabricación. Las condiciones asépticas de las zonas de trabajo están garantizadas por monitorización ambiental y controles apropiados definidos en los Procedimientos Normalizados de Trabajo que establecen las Normas de Correctas Fabricación. Durante todo el proceso se llevan a cabo diferentes controles de calidad para confirmar la ausencia de contaminación y la buena marcha del proceso.

4.5.3. Procedimiento de infusión intrarticular de las MSV

La recolección y preparación de las MSC se realiza en horario de mañana, se transportan en condiciones reglamentadas en contenedor isotermo entre 4-12 °C y se aplican antes de 6 horas. El paciente cursa los trámites administrativos correspondientes al ingreso y tratamiento en régimen ambulatorio y se persona en el área de cirugía ambulatoria de Centro Médico Teknon.

- Se realiza en quirófano de cirugía ambulatoria.
- El paciente se coloca en decúbito supino.
- Se procede a la antisepsia de la piel y entallado aséptico de la región.
- El facultativo responsable, del equipo de ITRT, tras preparación aséptica, vestido con bata y guantes estériles, efectúa la infusión de la dosis de MSC.
- Apósito estéril simple en el punto de infiltración.

4.5.4. Pauta Postratamiento

Después de la infusión celular intrarticular, salvo que ocurra alguna incidencia, se concede el alta hospitalaria a las 2 horas y se solicita al paciente que mantenga reposo relativo en domicilio durante 48 horas.

El seguimiento a largo plazo consiste en visitas clínicas y monitorización de RNM especificadas en el protocolo. Si por cualquier razón un paciente se retira del estudio se asegura que seguirán atendidos y tratados según "lex artis".

V. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DE HOMOGENEIDAD BASAL

GRUPO	N obs	N miss	Mean	Median	Std	Min	Max
PRP	12	0	56.00	60.00	15.13	31.00	75.00
MSC	12	0	56.92	62.00	14.74	32.00	75.00
TOTAL	24	0	56.46	60.00	14.62	31.00	75.00

Tabla 11 . Estadísticos descriptivos de la edad.
(No DS $p=0.8819$ / t-test para datos apareados)

Sexo	GRUPO				Total	
	PRP		MSC		N	%
	N	%	N	%		
F	3	25.0%	3	25.0%	6	25.0%
M	9	75.0%	9	75.0%	18	75.0%

Tabla 11. Estadísticos descriptivos del sexo
(No DS $p=1.000$ / Exact's Fisher Test)

GRUPO	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
PRP	12	0	23.50	22.41	2.12	21.22	26.72
MSC	12	0	23.40	23.33	1.52	21.22	26.30
TOTAL	24	0	23.45	23.14	1.80	21.22	26.72

IMC	GRUPO				Total	
	PRP		MSC		N	%
	N	%	N	%		
Normal	8	66.7%	10	83.3%	18	75.0%
Sobrepeso	4	33.3%	2	16.7%	6	25.0%

Tabla 13 . Estadísticos descriptivos de IMC.
(No DS $p=0.9317$ / Wilcoxon Test)

Distribución de los individuos con normopeso y sobrepeso en cada grupo
(No DS $p=0.6404$ / Exact's Fisher Test)

	GRUPO				Total	
	PRP		MSC		N	%
	N	%	N	%		
II	3	25.0%	2	16.7%	5	20.8%
III	3	25.0%	6	50.0%	9	37.5%
IV	6	50.0%	4	33.3%	10	41.7%

Tabla 14. Grados K & L. Distribución de los grados de artrosis en ambos grupos
(No DS $p=0.4441$ / LR Chi Square Test)

GRUPO	N	Nmiss	Mean	Median	Std
PRP EVA	12	0	5.64	6.00	1.64
MSC EVA	12	0	4.99	5.40	3.14
PRP WOMAC	12	0	22.83	21.00	7.66
MSC WOMAC	12	0	21.42	20.00	12.75

Tabla 15. Valores basales de los cuestionarios algofuncionales.
EVA ($p < 0.5338$ t-test); WOMAC ($p < 0.7446$ t-test)

No se encontraron diferencias significativas (DS) entre ambos grupos respecto a las características basales en las variables contempladas: Edad, Sexo, IMC, grado K&L y los índices algofuncionales EVA y WOMAC de ambos grupos.

La edad media también fue similar (56 PRP y 56,92 MSC).

Se agruparon por género, 9 hombres y 3 mujeres en ambos grupos. También se estratificaron en función del IMC.

Como se define en los criterios de inclusión, el grado de K&L está comprendido entre II-IV y los pacientes se aparearon por grados.

5.2. ANÁLISIS DE LOS CUESTIONARIOS ALGOFUNCIONALES

5.2.1. Estadísticos descriptivos de la EVA

GRUPO	T	N	N Miss	Mean	Median	Std Dev
PRP	0m	12	0	5.64	6.00	1.64
	6m	12	0	3.71	3.50	1.76
	12m	12	0	4.83	4.25	1.84
MSC	0m	12	0	4.99	5.40	3.14
	6m	12	0	1.97	1.70	1.60
	12m	12	0	1.63	1.90	1.46

Tabla 16. Estadísticos descriptivos de la evolución del dolor por escala EVA.

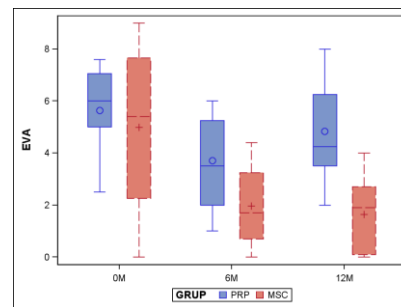


Fig. 26. Diagrama de caja de la evolución del dolor por escala EVA.

En ambos grupos se observa una disminución significativa del dolor (DS: PRP $p = 0.0072$; MSC $p < 0.0001$); más marcada en el grupo MSC (DS: Diferencia mejora del dolor entre PRP-MSC $p = 0.0096$).

A los 6 meses el dolor disminuye en ambos grupos (DS: PRP $p = 0.005$ y MSC $p < 0.0001$), aunque disminuye más en el grupo MSC (DS: diferencia entre grupos $p = 0.037$).

A los 12 meses en el grupo PRP se observa leve aumento del dolor, sin alcanzar niveles basales (0m-12m $p = 0.3573$) y en el grupo MSC el dolor sigue disminuyendo (0m-12m $p < 0.0001$).

La diferencia entre grupos a los 12 meses es significativa (DS: $p < 0.0003$).

GRUPO	T	T	Mean	Lower 95% CI	Upper 95% CI	Adj P
PRP	0m	6m	1.93	0.76	3.11	0.0052
	0m	12m	0.81	-.37	1.98	0.3573
	6m	12m	-1.1	-2.3	0.05	0.1429
MSC	0m	6m	3.03	1.85	4.2	<.0001
	0m	12m	3.36	2.18	4.53	<.0001
	6m	12m	0.33	-.84	1.51	0.8361

Tabla 17 . Análisis intra grupos EVA

A los 6 meses el grupo MSC presentó reducción de la EVA de casi 2 puntos respecto al grupo PRP (DS: p=0.037).

A los 12 meses la diferencia era superior a los 3 puntos (DS: p<0.0003).

En el grupo MSC se observaron diferencias significativas respecto al tiempo basal tanto a los 6 meses (p<0.0001) como a los 12 meses (p<0.0001).

No se encontraron DS entre los 6 y los 12 meses.

En el grupo PRP sólo se observaron DS entre el tiempo basal y los 6 meses (p=0,005).

A los 12 meses en el grupo PRP se observa leve aumento del dolor, sin alcanzar niveles basales (p=0.3573).

5.2.2. Estadísticos descriptivos del índice de Lequesne

GRUPO	T	N	Miss	Mean	Median	Std Dev
PRP	0m	12	0	2.16	2.12	0.41
	12m	12	0	1.63	1.70	0.76
MSC	0m	12	0	1.99	2.01	0.62
	12m	12	0	0.88	1.04	0.73

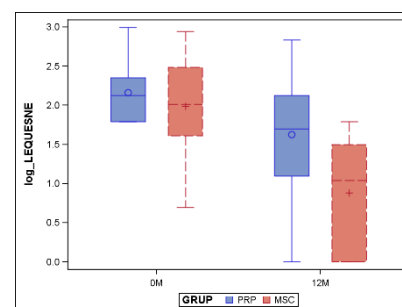


Tabla 18 y Fig. 27. Estadísticos descriptivos del Índice de Lequesne (log). El índice de Lequesne no presentaba una distribución Normal debido a la presencia de algunos valores muy altos que hacían aumentar la media y la variabilidad. Se normalizaron los datos mediante la transformación logarítmica.

A los 12 meses se encontraron diferencias de 0,75 puntos en escala logarítmica, lo que representa una diferencia de 2,1 puntos en la escala original y es estadísticamente significativa (DS: p=0.0078).

Se observaron DS en el tiempo en los dos grupos PRP: p=0.0027; MSC: p<0.0001.

Estas DS son mayores en el grupo MSC que en el grupo PRP (p=0.066).

5.2.3. Estadísticos descriptivos WOMAC

GRUP	Temps	N	N Miss	Mean	Median	Std Dev
PRP	0m	12	0	22.83	21.00	7.66
	12m	12	0	16.75	14.00	10.53
MSC	0m	12	0	21.42	20.00	12.75
	12m	12	0	9.75	9.50	6.93

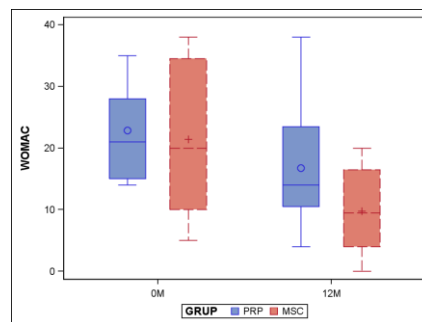


Tabla 19 y Fig. 28. Estadísticos descriptivos del Índice WOMAC.

Las medias del cuestionario WOMAC mejoraron en ambos grupos ($M \pm DE$ PRP: $22 \pm 9,6$ a $16,5 \pm 9$, $p=0.0014$; MSC : $20,8 \pm 10$ a 8 ± 5 , $p<.0001$) de forma significativa a los 12 meses.

PRP	0m	12m	MSC	0m	12m
1	38	22	1	28	13
2	23	20	2	25	13
3	24	7	3	14	5
4	28	18	4	6	0
5	15	7	5	15	6
6	25	23	6	14	4
7	8	11	7	8	6
8	7	10	8	15	4
9	30	25	9	34	16
10	33	35	10	38	19
11	18	4	11	23	4
12	15	16	12	30	7

Tabla 20. Media del WOMAC por paciente. 5/12 pacientes del grupo PRP mejoraron >26%; mientras 11/12 pacientes del grupo MSC mejoraron >26%. BSD=0.38 (Bonferroni significant difference: $p_1-p_2 > 1.96 \times SE$) por lo que la mejora en el grupo MSC fue significativamente mayor.

A los 12 meses se observaron DS en los dos grupos (PRP $p=0.0014$; MSC $p<.0001$). Estas DS son mayores en el grupo MSC que en el grupo PRP (BSD=0.38).

5.3. ANÁLISIS T2 MAPPING

5.3.1. Análisis de todos los valores T2 (88 ROI)

Grupo PRP

T2 0 m	T2 12 m			
Frecuencia Porcentaje	<30 ms	30-45 ms	>45 ms	Total
<30 ms	6 0.57	17 1.61	0 0.00	23 2.18
30-45 ms	71 6.74	561 53.28	69 6.55	701 66.57
>45 ms	9 0.85	103 9.78	217 20.61	329 31.24
Total	86 8.71	681 64.67	286 27.16	1053 100.00

Tabla 21. Grupo PRP. Representación gráfica de todos los ROIs (valor absoluto y %) 0m-12m. Los valores bajos (<30 ms) se incrementaron del 2 al 8%. De estos, 71 de 86 eran valores normales en la RMN basal. Los valores normales disminuyen del 66% al 64%. Los valores elevados se reducen el 31% al 27%.

Grupo MSC

T2 0 m	T2 12 m			
Frecuencia Porcentaje	<30 ms	30-45 ms	>45 ms	Total
<30 ms	16 1.52	55 5.21	0 0.00	71 6.72
30-45 ms	23 2.18	565 53.50	41 3.88	629 59.56
>45 ms	0 0.00	172 16.29	184 17.42	356 33.71
Total	39 3.69	792 75.00	225 21.31	1056 100.00

Tabla 22. Grupo MSC. Representación gráfica de todos los ROIs (valor absoluto y %) 0m-12m. Los valores bajos (<30 ms) disminuyeron del 6 al 3%. Los valores normales se incrementan del 59% al 75%. Los valores elevados se reducen el 31% al 21%.

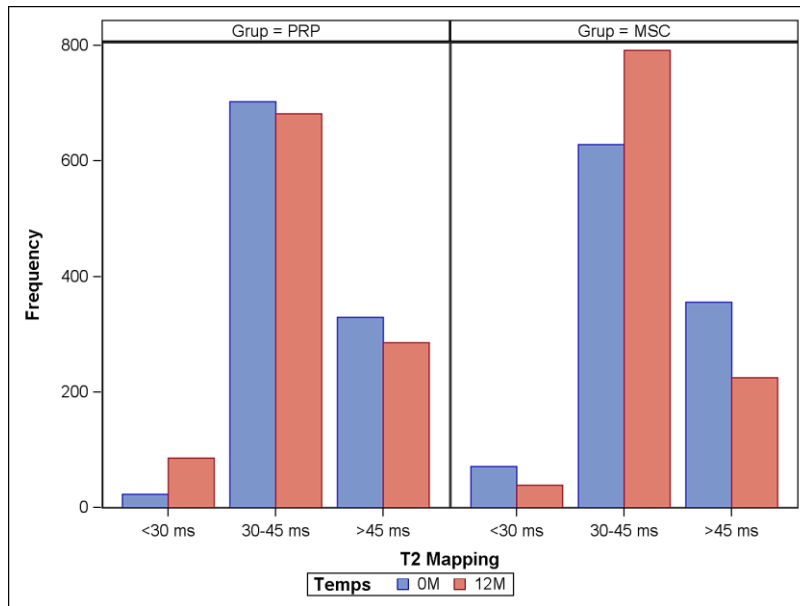


Fig. 29. Gráfico de barras de los 88 ROI según grupo y momento. En el grupo PRP disminuye el número de valores normales (30-45 ms) y aumenta su dispersión. En el grupo MSC el incremento de valores normales es evidente a los 12 meses, junto a la disminución de valores patológicos (<30 ms ó > 45 ms).

Valores T2 bajos:

En el grupo PRP aumentan del 2% al 8% ($p=0.07$).

En el grupo MSC descienden del 6% al 3% ($p=0.07$).

La diferencia entre grupos es significativa (DS: $p=0.015$).

Valores T2 normales:

En el grupo PRP descienden de 66% a 64% ($p=0.08$).

En el grupo MSC aumentan del 59% al 75% ($p<0.001$).

La diferencia entre grupos es significativa (DS: $p<0.001$).

Valores T2 elevados:

En el grupo PRP descienden de 31% a 27% ($p=0.188$).

En el grupo MSC descienden del 33% al 21% ($p<0.001$).

La diferencia entre grupos es significativa (DS: $p=0,043$).

El índice T2 global (T2 cartílago tratado / T2 cartílago normal):

En el **grupo PRP**, a los 0m 1 sujeto (8.3%) presentaba índice T2 global cercano a normalidad. A los 12 m 2 sujetos (16%) presentaban índice cercano a normalidad. Representa una mejoría del 7%.

En el **grupo MSC**, a los 0 m ningún sujeto (0%) presentaba valores cercanos a normalidad. A los 12 m 6 sujetos (50%) presentaban índice cercano a normalidad. Representa una mejoría del 50%.

5.3.2. Análisis de los valores T2 45-99ms

PRP		MSC	
	45-99 ms		45-99 ms
1	3± 9	1	78± 22
	46± 9		61± 18
2	49± 8	2	62± 16
	49± 7		51± 15
3	57± 10	3	54,9± 12
	48± 9		43,5± 7
4	70±20	4	61,6± 18
	61±17		46,8± 13
5	51± 7	5	54,7±11
	42± 6		40,5± 6
6	52± 10	6	50± 7
	51± 15		45± 5
7	47± 5	7	50,7± 4
	51± 10		43± 7
8	49± 14	8	60,8± 12
	50± 6		46,6± 9
9	54± 11	9	55± 10
	52± 12		43± 7
10	56± 13	10	64± 18
	60± 17		48± 15
11	44± 3	11	56± 11
	47± 8		42± 9
12	47± 4	12	68± 18
	42± 7		58± 20

Tabla 23. Estadísticos descriptivos de los valores T2 (ms) de 45 a 99 ms de 0m a 12 m.

La Media T2 de valores 45-99 ms mejoró en el grupo PRP en el 42% de los casos (significativamente en el 17%) y empeoró en el 58%.

En el grupo MSC la Media mejoró en el todos los pacientes (100%), (significativa en el 75%) de los casos y ninguno de ellos empeoró.

Análisis Variable : T2 Mapping								
Grup	Temps	N	N Miss	Mean	Median	Std Dev	Minimum	Maximum
PRP	0M	322	0	55.10	51.00	10.77	46.00	98.00
	12M	322	0	50.20	48.00	12.42	21.00	96.00
MSC	0M	318	0	56.33	52.00	11.45	46.00	97.00
	12M	318	0	46.21	45.00	10.05	30.00	98.00

Tabla 24. Evolución de la media y DE de los valores T2 45-99 ms. Los grupos presentan valores T2 basales muy homogéneos. Se observan diferencias a lo largo del tiempo ($p=0.001$). En el grupo PRP la reducción es de 4ms y en el grupo MSC de 10 ms. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

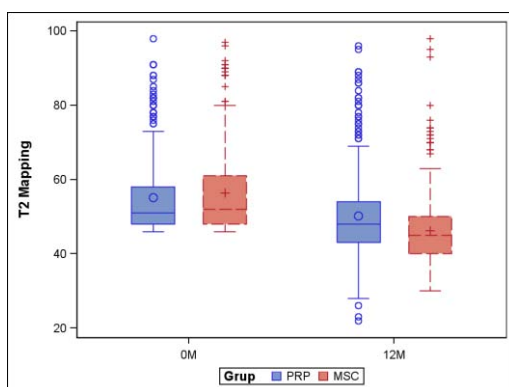


Fig. 30. Gráfico de cajas de los valores T2 patológicos según grupo y momento. Los resultados indican que el grupo MSC se comporta mejor que el grupo PRP, no solo en los valores T2 globales sino en la concordancia, ya que la DE es menor ($p < 0.05$ con paired t-test usando las DE de todos los pacientes). La gráfica refleja la evolución de la DE del grupo PRP, incrementando la dispersión tanto por encima como por debajo de la media (valor min. a los 12 m: 21ms). Contrasta con la DE del grupo MSC, que se reduce sobre todo a expensas de valores altos (valor min a los 12 m es: >30 ms).

La Media T2 de valores patológicos descendió en ambos grupos. En el grupo PRP la reducción fue de 4ms y en el grupo MSC de 10 ms. Esta diferencia es estadísticamente significativa (DS: $p < 0.001$).

5.3.3. Análisis de la Desviación Estándar de los valores T2 hasta 99 ms

Análisis Variable : T2 mapping						
Grupo	T	n	n Miss	DE	Min	Max
PRP	0m	982	1	11.16	27.00	98.00
	12m	1007	2	11.84	22.00	97.00
MSC	0m	979	0	12.35	16.00	97.00
	12m	997	0	9.49	26.00	98.00

Tabla 25. Estadísticos descriptivos de todos los valores T2 hasta 99 ms. Se observa mayor concordancia entre los valores T2 del grupo MSC que los del grupo PRP, ya que la desviación estándar del grupo PRP se incrementa y la del grupo MSC disminuye ($p < 0.05$ mediante paired t-test usando las DE de todos los pacientes).

Histograma de los valores T2 del Grupo PRP, a 0m (superior) y 12m (inferior)

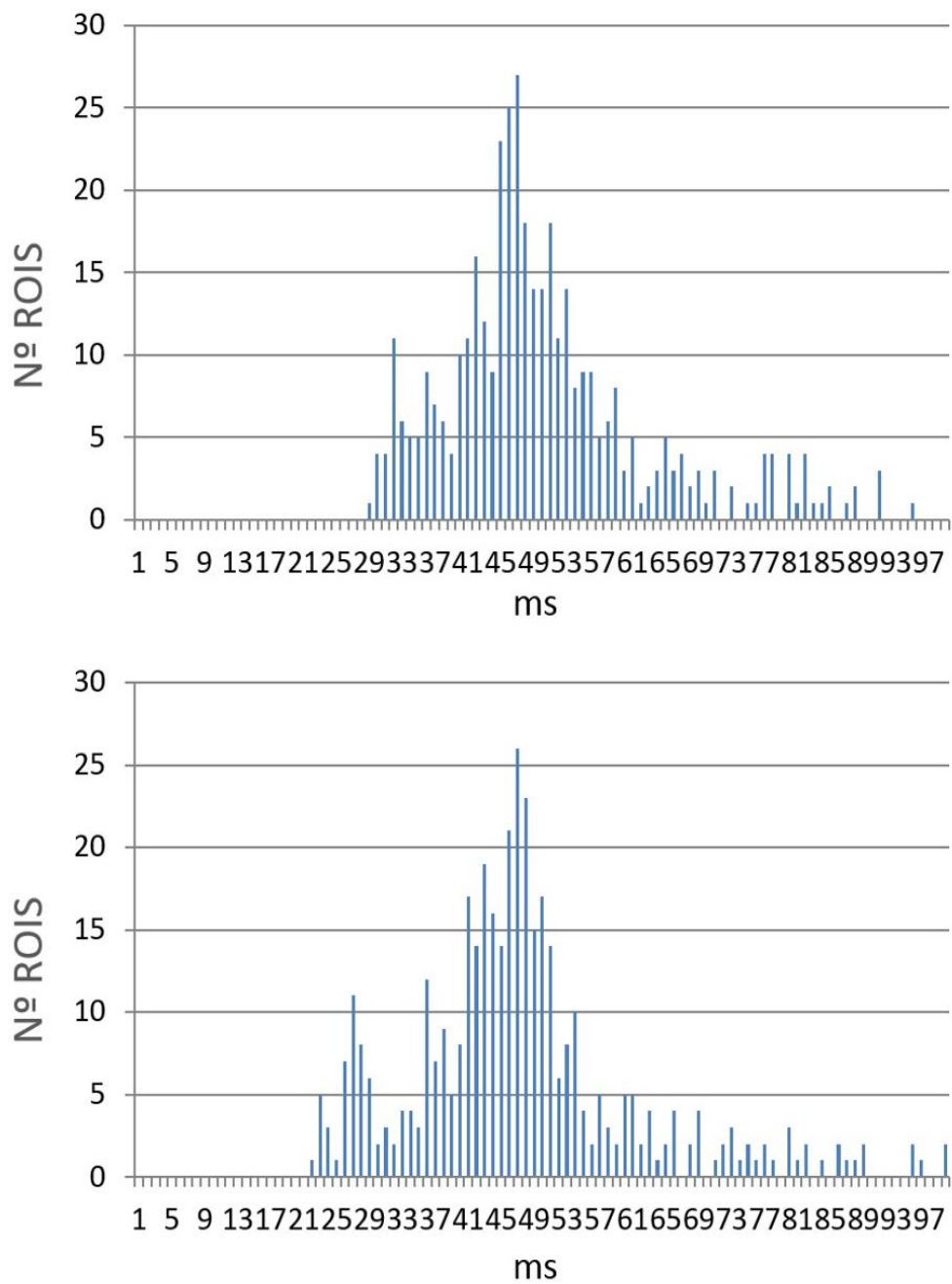


Fig. 31. Histograma del grupo PRP valores T2 hasta 99 ms.

Media \pm DE 0m: 42 ± 11.1 ms ; 12m: 40 ± 11.8 ms. Se observa la dispersión de los valores, incrementándose tanto a la derecha como a izquierda del eje de abscisas.

Histograma de los valores T2 del Grupo MSC, a 0m (superior)y 12m (inferior)

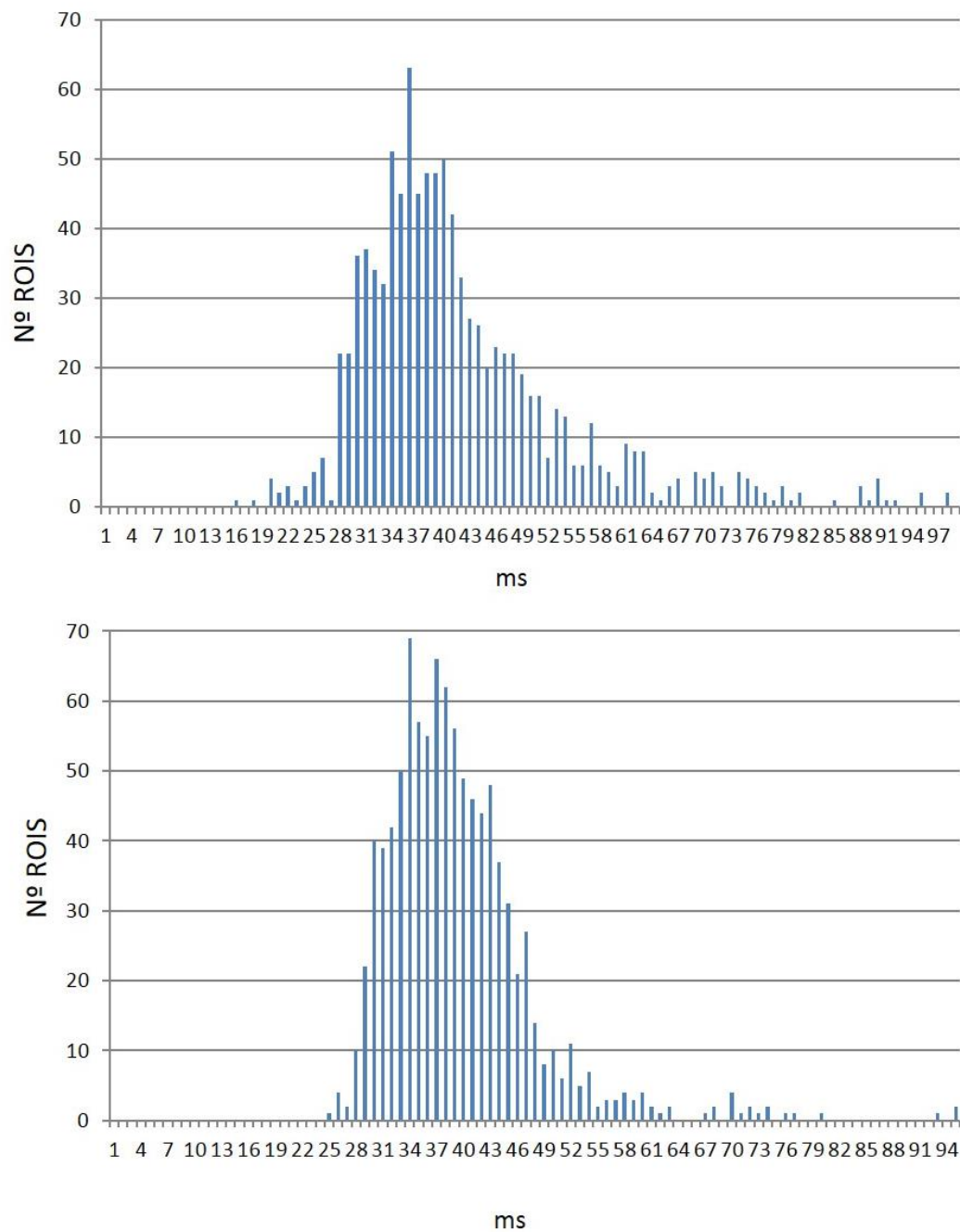


Fig 32. Histograma del grupo MSC valores T2 hasta 99 ms.

Media \pm DE 0m: 42 ± 12.2 ms ; 12m: 39 ± 8.2 ms. Se observa un agrupamiento de los valores alrededor de la media, a ambos lados del eje de abscisas.

Gráficos comparativos de la DE de todos los valores T2 (88 ROI)

Grupo PRP

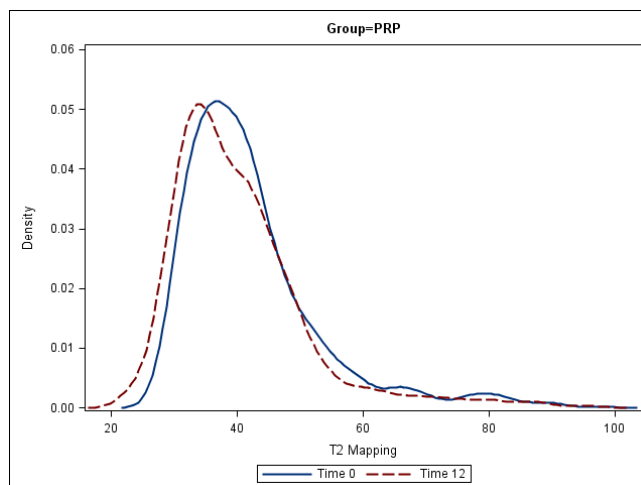


Fig. 33. DE del grupo PRP. La desviación estándar se incrementó a los 12 meses (DE 0m: 11.16ms; DE 12m 11.84ms). La línea discontinua roja (12m) no muestra un incremento de la curva alrededor de los valores normales, sino que se hace más amplia (incrementa la dispersión de los valores, aumentando la DE).

Grupo MSC

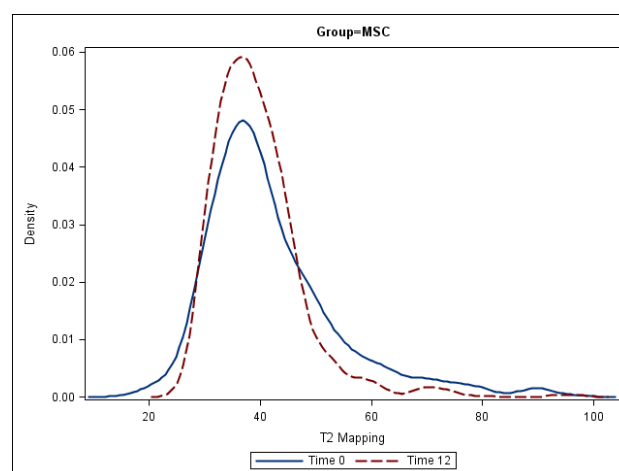


Fig. 34. DE del grupo MSC. La desviación estándar mostró una disminución significativa a los 12 meses (DE 0m: 12.29ms; DE 12m: 8.29ms). La línea discontinua roja muestra el agrupamiento de los valores alrededor de valores normales, estrechándose y disminuyendo la DE.

Se observan diferencias significativas en la DE de ambos grupos, la del grupo PRP se incrementa y la del grupo MSC disminuye ($p < 0.05$), se observa mayor concordancia entre los valores T2 del grupo MSC que los del grupo PRP.

5.3.4. Análisis Zonal

Análisis zonal del cartílago en ms				
GRUPO	n	Cartílago Profundo	Cartílago Superficial	p
PRP	6	39.50 (4.28)	44.50 (4.18)	0.3770
MSC	6	39.33 (5.24)	50.67 (7.23)	0.0529

Tabla 26. Variación zonal. Media (DE) en ms de los valores T2 profundo y T2 superficial de los 12 ROI estudiados a los 12 meses (2 x paciente, 3 sujetos del grupo PRP y 3 sujetos del grupo MSC).

En el grupo PRP no se observa variación espacial entre el cartílago profundo y el superficial ($p=0.377$). En el grupo MSC la diferencia entre el cartílago profundo y superficial es de 11.3 ms. No es estadísticamente significativa (t-test $p=0,053$) pero se observan diferencias significativas entre los dos grupos (t-test $p=0,043$).

Adicionalmente se calculó el Índice T2 zonal (T2 profundo/T2 superficial) del cartílago tratado.

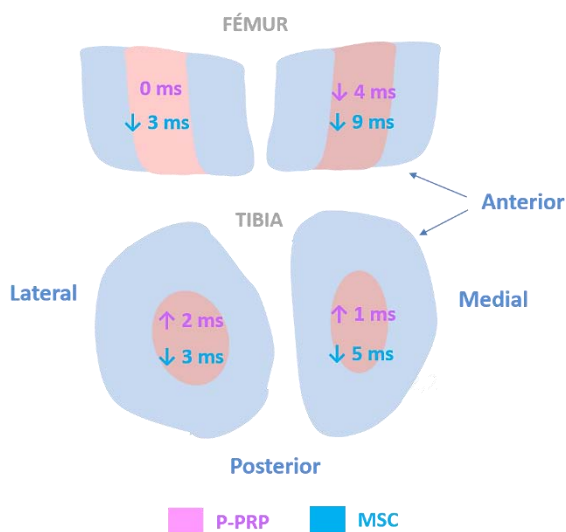
En el grupo PRP ningún ROI (0%) mostró un patrón parecido a cartílago normal.

En el grupo MSC 4 de 6 ROI (66%) mostraron un patrón parecido a cartílago normal.

En el grupo PRP no se observa variación espacial entre el cartílago profundo y el superficial ($p=0.377$). En el grupo MSC la diferencia entre el cartílago profundo y superficial es de 11.3 ms, aunque no es estadísticamente significativa (t-test $p=0,053$) Las diferencia entre grupos es significativa ($p=0,043$).

Índice T2 zonal a los 12 meses es similar al cartílago sano en 0/6 de los ROI (0%) del grupo PRP y 4/6 ROI (66%) del grupo MSC.

5.3.5. Análisis de los compartimentos de carga



La Fig. 35 muestra la modificación de la media de los valores T2 (ms) a los 12 m para cada compartimento y zona de carga.

CFE: PRP no se modifica; MSC mejora (-3ms).

CFI: PRP mejora (-4ms); MSC mejora (-9ms).

CTI: PRP empeora (+1 ms); MSC mejora (-5).

CTE: PRP empeora (+2ms); MSC mejora (-11ms).

Fig. 35. Modificación de la media de los valores T2 a los 12m por compartimentos

CFE: cóndilo femoral externo; CFI: cóndilo femoral interno
CTI: cóndilo tibial interno; CTE: cóndilo tibial externo

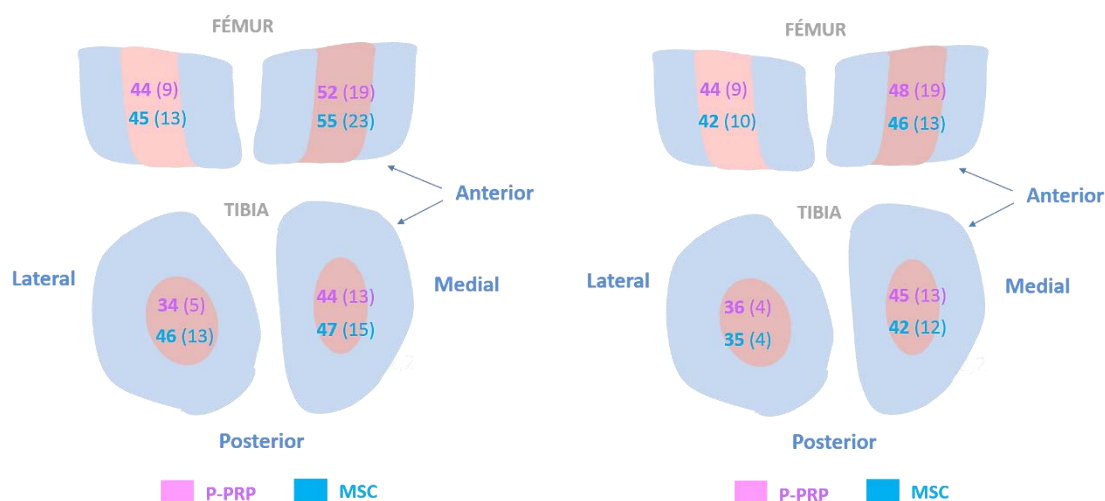


Fig. 36. Evolución de los valores T2 (ms) por compartimentos 0m-12m.

CFE: cóndilo femoral externo; CFI: cóndilo femoral interno; CTI: cóndilo tibial interno; CTE: cóndilo tibial externo

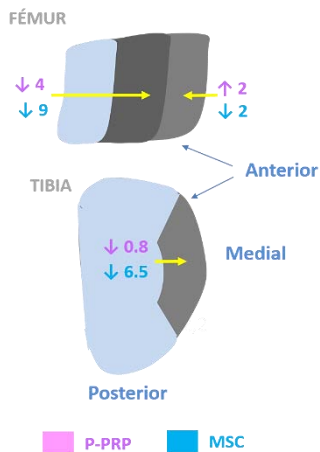
En la figura 36 se muestra la Media (DE) de los valores T2 (ms) en cada compartimento y para cada grupo de tratamiento a los 0m (figura izquierda) y 12m (figura derecha).

CFE: PRP no se modifica (44 ± 9 a 44 ± 9 ms); MSC mejora (45 ± 13 a 42 ± 10 ms).

CFI: PRP mejora y la DE no se modifica (52 ± 19 a 48 ± 19 ms); MSC mejoran media y DE (55 ± 23 a 46 ± 13 ms).

CTI: PRP empeora y la DE no se modifica (44 ± 13 a 45 ± 13 ms); MSC mejoran media y DE (47 ± 15 a 42 ± 13 ms).

CTE: PRP empeora (34 ± 5 a 36 ± 4 ms); o MSC mejoran media y DE (46 ± 13 a 35 ± 4 ms).



En la Fig. 37 se muestra el análisis de la evolución para cada grupo de tratamiento de los subcompartimentos mediales, destacados en color gris.

CFI med: PRP mejora (-4ms); MSC mejora (-9ms).

CFI lat: PRP empeora (+1 ms); MSC mejora (-3).

CTI lat: PRP mejora (-0.8ms); MSC mejora (-6.5ms).

Fig. 37. Análisis de los valores T2 de los subcompartimentos mediales.

CFI med: cóndilo femoral interno medial

CFI lat: cóndilo femoral interno lateral

En la tabla 27 se especifican los valores T2 en ms (M±DE) de los 12 pacientes de cada grupo para el subcompartimento lateral del fémur medial y el subcompartimento tibial medial.

($p < 0.05$ t-test para datos apareados, ajustado para edad, sexo, IMC, K&L basal y WOMAC basal).

LOC	T	PRP	MSC	p
FM lat	0m	48.1±2.3	49.8±2.3	
	12m	49.9,±2.7	46.7±2.0	
	delta	1.8	-3.1	<.005
TM lat	0m	39.9±2.6	48.4 ±2.5	
	12m	39.1 ±3.5	42.0±2.0	
	delta	-0.8	-6.4	<.0001

Tabla 27. Valores T2 (ms) de compartimento medial.

5.3.6. Análisis de correlaciones

Análisis de todos los ROI excluyendo los valores >100 ms.

GRUPO PRP		GRUPO MSC	
Valores T2		Valores T2	
WOMAC	0.56	WOMAC	0.74
	0.058		0.006

Tabla. 28. Correlación por grupos entre la variable WOMAC y T2. Esta es mayor en el grupo MSC que en el grupo PRP ($\rho=0,74$ y $\rho=0,56$ respectivamente). En el grupo MSC las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

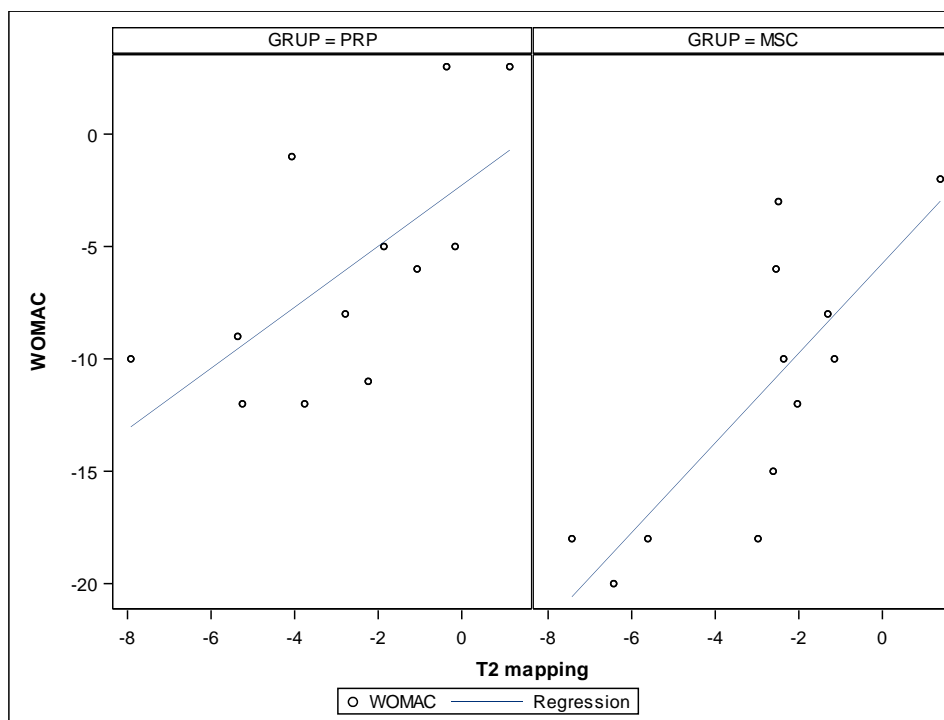


Fig.38. Diagrama de dispersión y recta de regresión según grupo entre T2-WOMAC. En el grupo MSC se observa una fuerte correlación entre el índice T2 y el WOMAC score ($\rho=0,74$; $p=0.006$), en tanto que la correlación es más débil entre los valores T2 del grupo PRP y el WOMAC score ($\rho=0,56$; $p=0.058$).

Se observa una correlación positiva entre la mejora de los valores T2 y el WOMAC. Esta es mayor en el grupo MSC que en el grupo PRP ($\rho=0,74$ y $\rho=0,56$ respectivamente). En el grupo MSC las diferencias son estadísticamente significativas (DS: $p < 0,01$)

VI. DISCUSIÓN

La rodilla es un «órgano» del aparato locomotor, al igual que el riñón lo es del excretor o el hígado del digestivo. Pensamos que su función mecánica de soporte o «bisagra» hace olvidar con frecuencia que es un órgano vivo, con una fisiología específica que, cuando se altera, desemboca en una fisiopatología cuyo conocimiento se encuentra en permanente evolución y a la que se ha de prestar atención si se pretende tratar con acierto la enfermedad.

Sin renunciar en absoluto a la idea que la artrosis en general, la gonartrosis en particular, puede ser causada y verse influida en su evolución por sobresolicitaciones mecánicas, entendemos que es una enfermedad que se desarrolla en un campo de batalla molecular; las terapias innovadoras que se proponen, como las basadas en células mesenquimales, se presentan a modo de antídoto de los fenómenos bioquímicos con tendencia catabólica inmanentes en esta enfermedad, mientras que la tecnología de imagen diagnóstica, también en continua innovación, hace posible cada vez más objetivar cuantitativamente si estas nuevas terapias son eficaces y superan a las terapias ya establecidas.

Es sabido que cualquier innovación conlleva una fase de adaptación. Aparte de algunos riesgos relacionados con el aprendizaje de sus ejecutores, este periodo suele soportar un componente cuanto menos de escepticismo sino de aversión por parte del colectivo profesional al que se dirige. Este negacionismo inicial se desvanece a medida que se demuestra su seguridad y eficacia... por este orden.

La terapia que hemos estudiado se enmarca en este ámbito. Su comprensión exige conocer algunos de los fundamentos que han llevado a la aplicación de las MSC y también del PRP, producto elegido como comparativo, así como los de la nueva tecnología de RMN con la que estudiamos la estructura del cartílago. En este sentido el recordatorio de la fisiopatología articular y en general todo el capítulo introductorio sólo ha tenido la intención de ordenar conceptos fundamentales para la comprensión del estudio, resaltando por ejemplo el cúmulo multifactorial causante de la desestructuración del cartílago artrósico, a pesar de un primer autointento regenerativo que quizás podamos favorecer a través de la terapia celular mesenquimal. Es evidente que el conocimiento relativo a todo ello va mucho más allá de lo expuesto en esta Memoria, lógicamente hemos mantenido la redacción dentro de los límites de nuestro entendimiento si bien el acceso a la bibliografía referenciada permite profundizar en estas materias.

No se ha descrito la anatomía ni abordado aspectos de la biomecánica articular cuyas alteraciones condicionan gran parte de la patología que manejamos en la práctica clínica y se imbrican con el tema que tratamos, al entender que son aspectos más conocidos y que aquí solo era preciso poner énfasis en las cuestiones relativas a nuestra línea de trabajo.

Asumimos que hubiera sido idóneo ampliar el tamaño muestral y desarrollar un ensayo clínico con todos los requerimientos de la máxima evidencia, pero estamos de acuerdo con el «TREND GROUP» que, aun partiendo de muestras limitadas y sin disponer de un grupo de control aleatorizado, también puede avanzarse en el conocimiento de forma sustancial.

En cualquier caso ponemos en valor que el estudio presentado es el primero del que tenemos constancia en el que se ha realizado el comparativo de las dos terapias contempladas, MSC expandidas y P-PRP.

Ciertamente los datos manejados tienen el inconveniente de partir de un tamaño muestral limitado. Este aspecto puede aplicarse a la inmensa mayoría de los estudios de la bibliografía que citamos en esta Memoria; es un inconveniente que también suele presentarse en modelo experimental animal e incluso en experimentación *in vitro*. La causa suele ser el importante coste económico que conlleva y que se incrementa proporcionalmente con la «n» contemplada.

Otro inconveniente es el tiempo de seguimiento limitado, también ligado a motivos económicos, ya que alargando el periodo de seguimiento probablemente hubiéramos detectado un aumento de las diferencias significativas entre grupos.

Aspecto a considerar es pues el coste-efectivo de los tratamientos que hemos analizado.

El tratamiento con P-PRP tiene un coste establecido dentro de un rango quizás comparable con otros productos farmacéuticos al uso como el HA. El proceso que conlleva la producción de un «medicamento de terapia avanzada» del que resulta una dosis de 40 millones de MSC es muy costoso y deben sumarse todos los condicionantes que implica su aplicación en medio quirúrgico, estudios preoperatorios con analíticas extensas, etc. Por tanto, el balance a favor de las MSC vendrá dado si se demuestra que el mayor nivel de eficacia evidenciado, tanto antiinflamatorio como regenerativo, se mantiene en el tiempo.

Este estudio no permite avanzar en este sentido porque el tiempo de seguimiento es limitado. Solo puede especularse a partir del conjunto de datos disponibles derivados de distintos estudios previos que adjuntamos a esta Memoria y los de tratamientos sucesivos con más de 4 años de seguimiento. Estos datos, sometidos al control de la AEMPS, indican por el momento una tendencia a la persistencia significativa del efecto antiinflamatorio y regenerativo de las MSC a lo largo del tiempo.

Pero no solo el obstáculo económico causa limitaciones, en nuestro caso, pese a tratar una muestra de sólo 24 sujetos, se ha requerido una evaluación previa de 157 candidatos tratados con PRP que fueran adecuados para la comparación mediante datos apareados. Esto ha implicado demoras importantes en el desarrollo de la tesis doctoral.

Dadas las notables diferencias entre los dos procedimientos estudiados fue imposible el cegamiento para el paciente y lógicamente también para los médicos aplicadores. Sin embargo pueden considerarse ciegos tanto los evaluadores radiólogos como los estadísticos. Los primeros por desconocer a que grupo de estudio pertenecían las exploraciones de resonancia magnética y los segundos por desconocer el alcance de los anagramas MSC y PRP.

En un ensayo que llevamos a cabo con MSC alogénicas utilizamos el HA como comparativo, este diseño permitió el enmascaramiento completo ya que se obvió el tiempo de obtención de médula ósea y el tratamiento consistió en la administración de una sola dosis inyectable en ambos grupos. Este planteamiento no es el que hemos efectuado en nuestro caso ya que partimos de MSC de médula ósea autóloga y por otra parte el tratamiento efectuado con P-PRP intenta obtener el mayor grado de eficacia que consideramos posible y esto implica, según nuestros protocolos, la administración de cuatro dosis en intervalos de 15 días.

Los resultados obtenidos han confirmado la hipótesis planteada. Por una parte se ha logrado un efecto analgésico con ambas terapias comparadas, muy por encima del porcentaje que pueda atribuirse al efecto placebo, siendo el efecto superior en el grupo MSC. La disminución del dolor y la mejoría de la función articular los atribuimos a un efecto antiinflamatorio que consideramos crucial para el control del proceso artrósico; se ha insistido en ello en el capítulo introductorio ya que la inflamación, además de ser causa de dolor y discapacidad, aumenta y acelera los fenómenos degradativos.

El índice algofuncional de Lequesne en valores superiores a 10-12, asociado a otros datos, se suele usar como indicativo de la necesidad de sustitución protésica. En la muestra analizada descendieron por debajo de estos valores límite los 4 sujetos del grupo MSC que superaban este valor con anterioridad al tratamiento, así como 2 de 3 del grupo P-PRP. Planteamos por tanto que mediante terapia con MSC es posible cuanto menos retrasar la indicación protésica en un colectivo sustancial de pacientes afectados por gonartrosis avanzada con el correspondiente posible beneficio socio-económico que esto puede suponer.

Sobre esta idea se está diseñando un estudio comparativo de grandes dimensiones que partirá de una muestra de pacientes en espera de implantación protésica que presenten determinados criterios de inclusión que los haga susceptibles de tratamiento con MSC.

Sabíamos por resultados de estudios previos que la eficacia analgésica, antiinflamatoria, evaluada mediante índices algofuncionales, era notable con los procedimientos terapéuticos que hemos aplicado, pero nos parece especialmente significativa la superioridad de la eficacia prolongada en el tiempo y la correlación matemática encontrada en la serie tratada con MSC, entre la mejoría del índice de discapacidad WOMAC y el descenso, es decir la mejoría, de los valores T2 relacionados con la estructuración del colágeno.

Respecto al potencial regenerativo de la terapia celular mesenquimal sobre el cartílago artrósico, debemos remitirnos a trabajos previos de nuestro equipo investigador cuyos resultados se exponen en detalle en las publicaciones anexas. Los ensayos clínicos fueron precedidos por estudios en modelo de gran animal ovino y equino que confirmaron la seguridad de uso, la viabilidad del procedimiento y evidenciaron histológicamente el efecto regenerativo sobre el cartílago tras lesión provocada; resultados que a su vez fueron sustentados por publicaciones de otros autores.

Es preciso un breve comentario sobre el término «regeneración» que venimos usando ya que en el medio clínico en que nos desenvolvemos, tiende entenderse como la recuperación de una normalidad histológica absoluta y por tanto puede inducir a la controversia; por esto se intenta evitar y en su lugar suele emplearse el término «reparación» como símil de «cicatrización».

Sin embargo el antónimo de «degeneración» es «regeneración» y no «reparación», por esto y también incentivados por evaluadores de los artículos publicados venimos aplicando el término «regeneración» cuando la tendencia del tejido es a estructurarse. Es decir nos parece procedente y práctico aplicar un gradiente regenerativo, cuando existe una tendencia a la reestructuración, de la misma forma que en práctica clínica se admite y aplica habitualmente el gradiente degenerativo en la tendencia a la desestructuración.

Efectivamente, distintas clasificaciones establecen un gradiente de la degradación del cartílago basándose en sus características morfológicas, sea macro o microscópicas. Estas clasificaciones implican la disposición bien de una imagen digamos fotográfica de la superficie del cartílago o bien histológica, lo que exige un acto invasivo para su obtención, anestesia y demás requerimientos quirúrgicos, no exentos de riesgos, que sólo son repetibles en limitadas ocasiones. Además, salvo que se trate de estudios en modelo de animal de experimentación, la toma de muestra biopsica se limita a un punto concreto de la articulación, no informa del estado del cartílago en su conjunto y en la artrosis, a diferencia de las lesiones focales, la alteración del cartílago varía y es difusa entre los distintos compartimentos.

De aquí el valor de la nueva tecnología de RMN que mediante mediciones de los valores T2 posibilita la cuantificación del estado de la estructura del tejido. Su aparición abrió la puerta a ensayos por parte de nuestro equipo que en ausencia de este avance quizás no se hubieran realizado. De hecho nuestro acceso a esta tecnología se produjo en sus inicios, cuando la experiencia en su uso a nivel mundial era escasa y no estaban establecidos los rangos de normalidad con tanta precisión como en la actualidad.

A diferencia del estudio mediante biopsia, biomarcadores como el T2 mapping son pueden cuantificar el estado de la estructura del cartílago en la totalidad de la rodilla, sin someter a riesgo quirúrgico ni de irradiación del paciente, pueden repetirse en tantas ocasiones como se requiera. El T2 mapping es pues una técnica fiable y validada que nos ha permitido obtener información biológica y trasladarla a números, probablemente se impondrá en la práctica clínica habitual.

Cualquier fármaco o técnica quirúrgica que se aplique sobre cartílago en los próximos tiempos deberá pasar por el tamiz de este u otro biomarcador similar. Esta es la idea que impulsó a la NIH, FDA, la OAI, diversas universidades americanas y multinacionales farmacéuticas a emplearla en el estudio observacional de grandes dimensiones que se está llevando a cabo.

Al finalizar la redacción de esta Memoria la aparición de bibliografía referente a T2 mapping es incesante y numerosa. Aunque los textos son difícilmente comprensibles desde el punto de vista de nuestra especialidad, vienen a refrendar la corrección del procedimiento que hemos seguido. Sin embargo asumimos la limitación de haber realizado los estudios con un dispositivo RMN de 1,5 T, pero es el que disponemos equipado con el software Cartigram® de General Electric adquirido expresamente en su día para nuestros ensayos clínicos. La mayoría de publicaciones actuales ya se refieren a resultados obtenidos con RMN de 3 T, tecnología especialmente deseable si se trata de determinar in vivo los valores T2 zonales.

En los ensayos clínicos que hemos realizado y en el estudio que motivó esta tesis doctoral, el T2 mapping contempló el análisis de 88 ROI lo que supone un análisis muy exhaustivo de la totalidad de la rodilla. Compárese con el importante estudio promocionado por el NIH y la OAI que hemos mencionado en el que se considera suficiente y adecuada la valoración de 11 ROI.

La motivación por nuestra parte de ampliar al máximo el número de zonas analizadas viene dada por el interés y obligación de valorar también si se producían efectos negativos en zonas sanas tras la infusión de un «Medicamento de Terapia Avanzada», producto considerado en investigación y sometido al control de la Administración sanitaria.

Como el objetivo era evaluar si el efecto de la terapia celular evitaba la tendencia ineludible a la desestructuración del cartílago artrósico, estimada en un 5-7% anual, o si al contrario se evidenciaba una mejora porcentual, en los ensayos efectuados establecimos como límite máximo del rango de normalidad valores T2 de 50 ms ya que valores superiores se consideraban indiscutiblemente patológicos; se observará el uso de esta cifra en las publicaciones anexas.

Actualmente el límite máximo de normalidad los situamos en 45 ms, siempre teniendo en cuenta el calibrado de nuestros dispositivos y la variabilidad que hemos determinado.

Entiéndase que los valores de relajación T2 sólo se consideran un biomarcador fiable si el error de reproducibilidad, que en nuestro caso es el 7% (dispositivo más observador), es menor que la diferencia entre los valores T2 de cartílago sano y los de T2 cartílago artrósico. Diferentes estudios demuestran que los valores T2 en artrosis son al menos un 12% mayores que los del cartílago sano lo que refuerza el valor de nuestros datos (Lee 2007, Joseph 2011, Baum 2012).

En la muestra analizada en nuestro estudio los valores T2 globales y zonales a los 12 meses alcanzaron valores semejantes a los del cartílago sano en 50% de los pacientes y en el 66% de los ROI del grupo MSC, reflejando organización de la red de colágeno similar a la del cartílago hialino, frente a los 16% de los pacientes y el 0% de los ROI del grupo PRP.

Ciertamente los resultados muestran una disminución de la media global de los valores T2 en ambos grupos y cualquiera que sea el grado de artrosis, aunque la disminución es significativamente mayor en el grupo MSC.

Esta disminución de los valores T2 puede tener diferentes interpretaciones. La disminución de los valores T2 globales no es un dato específico de regeneración, puede indicar simplemente que se ha producido una disminución del agua libre. El valor T2 está directamente relacionado con la disposición de las fibras de colágeno pero también con el contenido de agua. Si disminuimos el agua del tejido, sin llegar a organizarlo, puede bajar la media del T2, desplazándose la media a la izquierda, hacia valores inferiores a 30 ms.

La determinación de la DE y el análisis zonal pueden ser más específicos que la media global T2 para detectar cambios estructurales en la matriz del cartílago.

La DE es un indicador de homogeneidad/heterogeneidad de la arquitectura del tejido. Si tras el tratamiento la media global disminuye y la DE se «estrecha» alrededor de valores propios del cartílago hialino, indica reestructuración del tejido.

En la muestra tratada con P-PRP a pesar de disminuir la T2 global ligeramente, la DE aumenta con un desplazamiento de los valores hacia la izquierda. En cambio, en el grupo MSC disminuye la media de los valores T2 sin desplazar la mediana, ya que bajan los valores altos y se incrementan los valores bajos, por lo que la DE disminuye.

Es sugerente que la DE mejore tanto si estudiamos todos los valores, los 88 ROIs, como si estudiamos solo valores basales patológicos. El P-PRP aumenta por encima y por debajo de la media, el valor menor es 22 ms, mientras que en el grupo MSC se reduce tanto por encima como por debajo, el valor menor es 30 ms, no hay ningún valor menor de esta cifra.

El estudio de la estratificación no estaba previsto en el diseño inicial. El interés en realizarlo surgió a causa del conocimiento generado durante el desarrollo del mismo.

Lo hemos introducido, contemplando una muestra muy reducida, para que quede constancia del interés de este concepto sin considerar los resultados en las conclusiones, asumiendo la muy pequeña muestra analizada y también la limitación tecnológica ya que para obtener datos fiables se requiere una resolución de 3 T.

En el cartílago hialino normal los valores T2 del cartílago profundo son menores que en el cartílago superficial, esto viene condicionado por la disposición de las fibras de colágeno.

En el grupo MSC hemos registrado a los 12 meses una tendencia a la estratificación en el 66% de los valores T2 de los ROI estudiados, lo que implica reestructuración de la arquitectura de la red de colágeno. El grupo P-PRP no muestra esta estratificación. Esta diferencia indica que el primer tratamiento incide de alguna manera sobre el colágeno; inmediatamente comentaremos la posible influencia sobre los PG.

El estudio de los valores T2 según la localización del cartílago en los distintos compartimentos también parece aportar información adicional. El cartílago sano presenta diferencias de espesor según su localización sea femoral, tibial, externa o interna, y hemos observado que a mayor sea su espesor, mayores son las diferencias entre MSC y P-PRP, tanto respecto los valores de la media como de la DE.

Por otro lado los cambios causados por la artrosis parecen comenzar de forma precoz en el compartimento medial. Es en este en que mejoran de forma discreta los valores T2 de los casos tratados con P-PRP a diferencia de los tratados con MSC que mejoran significativamente.

Todo induce a pensar que el tratamiento con MSC está modificando el contenido de PG en sentido positivo.

En el grupo MSC disminuye la media y la DE de los T2 del cartílago con mayor grosor. En cambio en el grupo PRP los valores T2 mejoran en el cartílago menos grueso y a medida que aumenta el grosor empeoran. Es decir, cuanto más amplia es la zona radial rica en PG, el P-PRP parece mostrar una tendencia a ejercer menos efecto. Ha de tenerse en cuenta que en las áreas de carga del cartílago predomina la zona radial, más rica en PG que la zona superficial.

Hubiéramos avanzado más en el conocimiento de estos aspectos y ayudado a la demostración de diferencias si hubiéramos complementado el estudio mediante la técnica «d-GEMRIC». Aún sin ello y sin haberlo constatado, siguiendo los conceptos de Reiter, podemos especular que el PRP tiene potencial para disminuir el T2 a expensas de disminuir el contenido de agua libre, sin influir en el colágeno ni los PG, mientras que las MSC disminuyen los valores T2 por su acción sobre estos dos componentes en el sentido de la reestructuración del colágeno y aumento del número de PG.

A tenor de los resultados positivos obtenidos que confirman el interés de esta línea de investigación se plantea la necesidad de profundizar y ampliar el conocimiento. Existen infinitas variables que pueden aumentar el potencial terapéutico del procedimiento estudiado. Por ejemplo sabemos que el efecto ha de ser de alguna u otra forma dosis-dependiente.

Se asume que las «dosis» empleadas en uno y otro caso, MSC o P-PRP, son optimizables. Tienen cierto origen empírico aunque las estamos empleando tras evidenciar indicios de eficacia en animales de experimentación.

Debe existir una dosis mínima de MSC suficientemente eficaz. Menos MSC supone menos costes y tiempo de producción aspecto que motiva encontrarla.

Por otra parte debe existir un número máximo de células que se corresponde a la máxima eficacia, sobrepasarlo supondrá empeorar el resultado y esto es porque las células requieren el aporte de nutrientes adecuado. La competencia entre ellas por el acceso al oxígeno y a los nutrientes junto al acúmulo en el medio de residuos catabólicos puede deteriorar su normal metabolismo y crecimiento. Por ejemplo ahora sabemos que durante el transporte en jeringa no debemos superar una concentración celular superior a 10×10^6 MSC por mL.

Es decir podemos encontrarnos ante estudios muy bien diseñados pero que fracasen en su objetivo por no administrar suficiente dosis celular pero también por excederla.

La búsqueda de la dosis óptima es objetivo preferente de próximos estudios. Conviene encontrarla, su beneficio tiene una vertiente relativa a la eficacia y otra económica.

Hoy por hoy hemos apreciado tendencia a la mejoría tras la administración de una sola dosis celular de 40×10^6 MSC y hemos visto que esta tendencia prosigue o se mantiene. Es razonable pensar que la administración de una o varias dosis repetidas, aprovechando la disponibilidad de alícuotas de MSC criopreservadas, podrían mejorar el efecto obtenido. Esta es otra de las próximas investigaciones que pretendemos afrontar.

Sin embargo la «dosis», siendo una variable fundamental, no determina por sí sola el efecto que podemos esperar tras la aplicación de MSC o también P-PRP porque el «principio activo» de estos medicamentos biológicos no son las células o las plaquetas en sí mismas sino las citoquinas, exosomas y otras sustancias que liberan, muy diversas en tipo y número en cada caso. Por su parte el efecto dependerá también de la disponibilidad de células diana y receptores para estas citoquinas. En definitiva, aunque la terminología empleada, digamos administrativa, haga referencia a estos productos como «medicamentos», su farmacocinética y farmacodinamia son esencialmente diferentes de las de un medicamento clásico de síntesis.

Según las directrices de la «*Scottish Intercollegiate Guidelines Network*» o del «*National Institute for Health and Clinical Excellence*», el estudio presentado puede considerarse que posiciona los resultados en un nivel de evidencia científica «2+» ó «IIa», siempre y cuando se considere que ha sido bien realizado, controlados los potenciales sesgos y que existe poca probabilidad de que la relación sea causal. Estos aspectos se han valorado en su diseño tal como se describe en el capítulo introductorio. Como medida previa se aseguró que la composición de los grupos MSC y P-PRP fuera la adecuada para que pudieran ser considerados comparables. Nótese que, aunque no era un criterio establecido de antemano, por azar también se logró la homogeneidad de ambas muestras respecto a los valores basales T2.

A efectos de comprobación de la metodología seguida se han completado todos los ítems de la lista de verificación o «*checklist*» recomendada por el «*Transparent Reporting of Evaluations with Non-randomized Design*» o «*TREND GROUP*» para estudios no aleatorizados que adjuntamos en el anexo I de esta Memoria que cerramos aplicándonos la cita de Kelvin que la introduce, esperando haber sustentado los resultados y avanzado en el conocimiento de la materia sobre la que se ha tratado habiendo sido capaz de expresarlo en números.

VII. CONCLUSIONES

1. La eficacia respecto a mejoría del dolor, evaluada mediante la escala EVA, se obtuvo con ambos tratamientos. A los 6 meses el dolor mejoró en los dos grupos de forma significativa pero a los 12 meses solo el grupo MSC siguió presentando tendencia a la mejoría de forma significativa.
Los cuestionarios algofuncionales Lequesne y WOMAC también denotaron mejoría significativa en ambos grupos pero la mejoría del grupo MSC fue significativamente superior a la del grupo P-PRP.
2. La eficacia regenerativa evaluada mediante la Media y la DE de los valores T2 patológicos se demostró para el grupo MSC en el que mejoró la Media en el 100% de los casos y disminuyó la DE de forma significativa incluso en los subcompartimentos mediales en los que se considera que los cambios en la artrosis son precoces, mientras que el grupo P-PRP la Media mejoró en el 42% de los casos, empeoró en el 58% de los casos y la DE se incrementó.

VII. CONCLUSIONS

1. Both treatments were proven effective in terms of pain improvement assessed by the VAS scale. At 6 months both groups achieved significant improvement, while at 12 months only MSC still showed significant improvement.
Algofunctional questionnaires Lequesne and WOMAC also improved in both groups, but the improvement was significantly higher in group MSC compared to group PRP.
2. The regenerative potential assessed by T2 Mean and SD was proven in the MSC group, in which the mean improved in 100% of the subjects and the SD decreased significantly, even in the medial compartments in which OA seems to start earlier. Group PRP improved T2 Mean in 42% and worsened in 58% of the subjects and the SD of T2 values increased.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aronson JK. (2005) Biomarkers and surrogate endpoints. *Br J Clin Pharmacol*, 59(5), 491-494.
- Abellanet I. (2009). La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencia clínica y bioquímica que valida su utilización. Tesis Doctoral. Departament de Medicina i Cirurgia Animals. UAB.
- Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. (1990). Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*, 75 (1),128-38.
- Aggarwal S, Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. *Blood*,105(4),1815-22.
- Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, Toda K. (2006). Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intrarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 14,1307-14.
- Aigner T. (2007). Osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 19(5),427-8.
- Altman R, Abadie E, Avouac B. (2005). Total joint replacement of hip or knee as an outcome measure for structure modifying trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(1),13–19.
- Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). (1988). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol*,128,179-89.
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91(1),4-15.
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J, Andía I. (2007). Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology*,46(12), 1769-72.
- Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*,32(3),252-60.
- Apprich S, Welsch GH, Mamisch TC, Szomolanyi P, Mayerhoefer M, Pinker K, Trattnig S. (2010). Detection of degenerative cartilage disease: comparison of high-resolution morphological MR and quantitative T2 mapping at 3.0 Tesla. *Osteoarthritis Cartilage*,18 (9),1211-7.
- Archer CW, Redman S, Bishop J, Bowyer S, Dowthwaite GP. (2002). The identification and characterization of articular cartilage progenitor cells. *Transactions of the 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Res Society* S009.
- Arden N, Nevitt MC. (2006). Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*,20(1),3-25.
- Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, MacKillop N, Dougados M. (2005). Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis – results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage*,13(5),361-7.
- Bader DL, Kempson GE. (1994). The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. *Biomed Mater Eng*,4(3),245-56.
- Bae JH, Hosseini A, Wang Y, Torriani M, Gill TJ, Grodzinsky AJ, Li G. (2015). Articular cartilage of the knee 3 years after ACL reconstruction. A quantitative T2 relaxometry analysis of 10 knees. *Acta Orthop*,86(5),605-10.
- Bai J. (2011). Translational Biomarkers: from Preclinical to Clinical a Report of 2009 AAPS/ACCP Biomarker Workshop. *The AAPS J*,13(2),274-283.

- Batlle-Gualda E, Esteve-Vives J, Piera MC, Hargreaves R, Cutts J. (1999). Adaptación transcultural del cuestionario WOMAC específico para artrosis de rodilla y cadera. *Rev Esp Reumatol*, 26,38-45.
- Bauer DC, Garnero P, Hochberg MC, Santora A, Delmas P, Ewing SK, Black DM. (2006). Fracture Intervention Research Group. Pretreatment levels of bone turnover and the antifracture efficacy of alendronate: the fracture intervention trial. *J Bone Miner Res*,21(2),292-9.
- Baum T, Joseph GB, Arulanandan A, Nardo L, Virayavanich W, Carballido-Gamio J, Nevitt MC, Lynch J, McCulloch CE, Link TM. (2012). Association of magnetic resonance imaging-based knee cartilage T2 measurements and focal knee lesions with knee pain: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res*,64(2),248-55.
- Baum T, Joseph GB, Karampinos DC, Jungmann PM, Link TM, Bauer JS. (2013). Cartilage and meniscal T2 relaxation time as non-invasive biomarker for knee osteoarthritis and cartilage repair procedures. *Osteoarthritis Cartilage*, 21(10),1474-84.
- Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, Chowanec D, Falcone LM, Dugdale EM, Deberardino TM, Arciero RA, Mazzocca AD. (2012). Rapid isolation of human stem cells (connective progenitor cells) from the distal femur during arthroscopic knee surgery. *Arthroscopy*,28(1),74-84.
- Berdasco M, Esteller M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Res Ther*, 2,42.
- Berdasco M, Melguizo C, Prados J, Gómez A, Alaminos M, Pujana MA, López M, Setien F, Ortiz R, Zafra I, Aranega A, Esteller M. (2012). DNA Methylation Plasticity of Human Adipose-Derived stem Cells in Lineage Commitment. *Am J Pathol*,181(6),2079-93.
- Bhosale AM, Richardson JB. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*,87,77-95.
- Bijlsma JW, Hagemeyer JW, Bijl M, Jansen TL, van de Laar MA, Landewé RB, Nurmoahmed MT. (2011). The multidisciplinary practice guideline "The responsible use of biologicals. *Ned Tijdschr Geneesk*,155,30-31.
- Binks DA, Hodgson RJ, Ries ME, Foster RJ, Smye SW, McGonagle D, Radjenovic A. (2013). Quantitative parametric MRI of articular cartilage: a review of progress and open challenges. *Br J Radiol*,86(1023),20120163.
- Blain EJ. (2009). Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *Int J Exp Pathol*,90(1),1-15.
- Blazquez R., Sanchez-Margallo, F.M., de la Rosa, O., Dalemans, W., Alvarez, V., Tarazona, R., and Casado, J.G. (2014). Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front. Immunol*,5,556.
- Blumenkrantz G, Majumdar S. (2007). Quantitative magnetic resonance imaging of articular cartilage in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*, 13,75–86.
- Bodo M, Carinci P, Baroni T. (1998). Role of growth factor on extracellular matrix production by chick embryo fibroblast in vitro: antagonist effect of TGF-beta through the control of IL-1 and IL-1ra secretion. *Cytokine*,10(5),353-60.
- Borrelli J. (2006). Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis. *J Orthop Trauma*,20(10),726-31.
- Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. (2001). Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop*,S391,337-48.
- Brosseau L, Rahman P, Toupin-April K, Poitras S, King J, De Angelis G, Loew L, Casimiro L, Paterson G, McEwan J. (2014). A systematic critical appraisal for non-pharmacological management of osteoarthritis using the appraisal of guidelines research and evaluation II instrument. *PLoS One*,9(1),e82986.

- Buck RJ, Wyman BT, Hellio Le Graverand MP, Hunter D, Vignon E, Wirth W, Eckstein F. (2011). Using ordered values of subregional cartilage thickness change increases sensitivity in detecting risk factors for osteoarthritis progression. *Osteoarthritis Cartilage*,19(3),302-8.
- Buck RJ, Wirth W, Dreher D, Nevitt M, Eckstein F. (2013). Frequency and spatial distribution of cartilage thickness change in knee osteoarthritis and its relation to clinical and radiographic covariates – data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthritis cartilage*,21(1),102-9.
- Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD. (2006). Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology*,43(3-4),603-9.
- Burstein D, Gray M, Mosher T, Dardzinski B. (2009). Measures of molecular composition and structure in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*,47(4),675-86.
- Caplan AI, Dennis JE. (2011). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*,98(5),1076-84. Review.
- Caplan AI. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*,213(2),341-7. Review.
- Carmona JU. 2006. Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse: preliminary clinical studies and cellular and molecular evaluation of equine concentrates obtained by single and double centrifugation tube methods. Tesis Doctoral. Departament de Medicina i Cirurgia Animals. UAB.
- Chang, G., Xia, D., Sherman, O., Strauss, E., Jazrawi, L., Recht, M. P., & Regatte, R. R. (2013). High resolution morphologic imaging and T2 mapping of cartilage at 7 Tesla: comparison of cartilage repair patients and healthy controls. *Magma (New York, N.Y.)*, 26(6), 539–548.
- Chen X, Zhou Y, Wang L, Santare MH, Wan LQ, Lu XL. (2016). Determining Tension-Compression Nonlinear Mechanical Properties of Articular Cartilage from Indentation Testing. *Ann Biomed Eng*, 44(4),1148-58.
- Chevalier X.(1998). Physiopathogenesis of osteoarthritis. The osteoarthritic cartilage. *Presse Med*,27,81-7.
- Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. (2012). Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100(4),948-55.
- Choi WJ, Hwang SJ, Song JG, Leem JG, Kang YU, Park PH, Shin JW. (2011). Radiofrequency treatment relieves chronic knee osteoarthritis pain: a double-blind randomized controlled trial. *Pain*,152(3),481-7.
- Chung DJ, Hayashi K, Toupadakis CA, Wong A, Yellowley CE. (2010). Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res Vet Sci*,92(1),66-75.
- Crema MD, Roemer FW, Marra MD, Burstein D, Gold GE, Eckstein F, Baum T, Mosher TJ, Carrino JA, Guermazi A. (2011). Articular Cartilage in the Knee: Current MR Imaging Techniques and Applications in Clinical Practice and Research. *Radiographics*, 31(1),37-61.
- Conaghan PG, Hunter DJ, Maillefert JF, Reichmann WM, Losina E. (2011). Summary and recommendations of the OARSI FDA osteoarthritis Assessment of Structural Change Working Group. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(5),606–610.
- Dardzinski BJ, Mosher TJ, Li S, Van Slyke MA, Smith MB. (1997). Spatial variation of T2 in human articular cartilage. *Radiology*,205(2),546-50.
- Davidson JM. (2007). Growth factors: the promise and the problems. *Int J Low Extrem Wounds*. 2007;6(1):8-10.
- D’Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell Jr. CW, Lotz MK. (2001). Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*,9,712-9.

- David-Vaudey E, Ghosh S, M. Ries, and Majumdar S. (2004). T2 relaxation time measurements in osteoarthritis. *Magnetic Resonance Imaging*, 22(5),673– 82.
- Dennison E, Cooper C. (2003). The natural history and prognosis of osteoarthritis. *Osteoarthritis*,2,227-33.
- De Lange-Brokaar, B.J.E., Ioan-Facsinay, A., van Osch, G.J.V.M., Zuurmond, A.-M., Schoones, J., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2012). Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*,20(12),1484-99.
- Delclós J, Diaz Bertrana C, Rodriguez Gómez L, Durall Rivas I, Soler Rich R, Pumarola M, Orozco L. (2007). Efecto del plasma rico en plaquetas autólogo sobre la interfase electrodo-miocardio en la estimulación cardíaca epicárdica. *Cuadernos Técnicos de Estimulación Cardíaca*,15.
- Des Jarlais DC, Lyles C, Crepaz N; TREND Group. (2004). Improving the reporting quality of nonrandomized evaluations of behavioral and public health interventions: the TRENDstatement. *Am J Public Health*,94(3),361-6.
- Dieppe P. (1995). Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*,3(2),73-7.
- Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. (1995). The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*,53(10),1182-92.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*,8(4),315-7.
- Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. (2010). Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*,223(1),27-35.
- Dougados M, Gueguen A, Nguyen M, Thiesce A, Listrat V, Jacob L. (1992). Longitudinal radiologic evaluation of osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*,19,378-84.
- Dougados M, Leclaire P, Van der Heijde D, Bloch DA, Bellamy N, Altman RD. (2000). Response Criteria for clinical trails on osteoarthrosis of the knee and hip: a report of the Osteoarthritis Research Society International Standing Committee for Clinical Trials response criteria initiative. *Osteoarthritis Cartilage*,8(6),395-403.
- Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. (2009). Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*,189(5),317-26.
- Dunn TC, Lu Y, Jin H, Ries MD, Majumdar S. (2004). T2 relaxation time of cartilage at MR imaging: comparison with severity of knee osteoarthritis. *Radiology*, 232,592–8.
- Eberhardt R, Zwingers T, Hofmann R. DMSO in patients with active gonarthrosis. (1995). A double-blind placebo controlled phase III study. *Fortschr Med*,113(31),446-50.
- Eckstein F, Mosher T, Hunter D. (2007). Imaging of knee osteoarthritis: data beyond the beauty. *Curr Opin Rheumatol*, 19,435–43.
- Eckstein F, Wirth W, Hudelmaier M, Stein V, Lengfelder V, Cahue S, Marshall M, Prasad P, Sharma L. (2008). Patterns of femorotibial cartilage loss in knees with neutral, varus, and valgus alignment. *Arthritis Rheum*,59(11):1563-70.
- Eckstein F, Wirth W, Hunter DJ, Guermazi A, Kwok CK, Nelson DR, Benichou O; OAI Investigators.(2010). Magnitude and regional distribution of cartilage loss associated with grades of joint space narrowing in radiographic osteoarthritis-data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). *Osteoarthritis Cartilage*,18(6),760-8.

- Eckstein F, Wirth W. (2011). Quantitative cartilage imaging in knee osteoarthritis. *Arthritis*, 2011,475684.
- Ehrenfest DMD, Andia I, Zumstein MA, Zhang Ch-Q, Pinto NR, Bielecki T. (2014). Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*, 4(1), 3–9.
- Emrani P, Katz J, Kessler C, Reichmann W, Wright E, McAlindon T, Losina E. (2008). Joint space narrowing and Kellgren–Lawrence progression in knee osteoarthritis: an analytic literature synthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(8), 873–882.
- Escobar A, Quintana JM, Bilbao A, Azkárate J, Güenaga JI. (2002). Validation of the Spanish version of the WOMAC questionnaire for patients with hip or knee osteoarthritis. Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index. *Clin Rheumatol*, 21(6), 466–71.
- Eyre D. (2002). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4(1), 30–5.
- Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*, 12, 57–63.
- Fary RE, Carroll GJ, Briffa TG, Briffa NK. (2011). The effectiveness of pulsed electrical stimulation in the management of osteoarthritis of the knee: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, repeated-measures trial. *Arthritis Rheum*, 63(5), 1333–42.
- Faucher J, Poirudeau S, Lefevre-Colau MM, Rannou F, Fermanian J, Revel M. (2004). Assessment of the test-retest reliability and construct validity of a modified WOMAC index in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 71, 121–7.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2), 237–46.
- Fernandez-Lopez JC1, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L; EPISER Study Group. (2008). Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clin Exp Rheumatol*, 26(2), 324–32.
- Fibbe WE. (2002). Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*, 61(SII), 29–31.
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. (2003). Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 790–800.
- Filardo G, Kon E, Di Martino A, Di Matteo B, Merli ML, Cenacchi A, Fornasari PM and Marcacci M. (2012). Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord*, 13, 229.
- Frank MH, Sayegh MH. (2004). Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363(9419), 1411–12.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, (4), 393–403.
- Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. (2005). Evaluation of autologous conditioned serum using an experimental model of equine osteoarthritis. *AAEP Proceedings*, 51, 374–375.
- Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, Kawcak CE, McIlwraith CW. (2008). Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(10), 1196–204.
- Foo, L F; Chong, L R; Koff, M F; Truncala, K; Semler, E; Riley, T; Rodeo, S A, Potter, H G. (2009). Quantitative MR Imaging of Cartilage Repair in a Goat Model. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. *ORS*, Paper No. 290
- Fuller CJ, Barr AR, Dieppe PA. (2001). Variations in cartilage catabolism in different equine joints in response to interleukin-1 in vitro. *Vet Rec*, 148(7), 204–6.

- Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. (2007). The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range motion. *Int. Orthop*, 31(3),309-13.
- Glaser C, Mendlik T, Dinges J. (2006). Global and regional reproducibility of T2 relaxation time measurements in human patellar cartilage. *Magn Reson Med*, 56,527–34.
- Gold GE, Chen CA, Koo S, Hargreaves BA, Bangerter NK. (2009). Recent advances in MRI of articular cartilage. *AJR Am J Roentgenol*,193(3),628-38.
- Goldring MB, Berenbaum F. (2004). The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*, 427,S37-46.
- Gray ML, Burstein D, Kim YJ, Maroudas A. (2008). Elizabeth Winston Lanier Award Winner. Magnetic resonance imaging of cartilage glycosaminoglycan: basic principles, imaging technique, and clinical applications. *J Orthop Res*, 26(3),281-91. Review.
- Grimshaw MJ, Mason RM. (2000). Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5),386-92.
- Ha CW, Park YB. Mesenchymal Stem Cell Injection for Osteochondral Lesions of the Talus: Letter to the Editor. *Am J Sports Med*. 2014;42(2):NP19-20.
- Hannila I, Ränkä SS, Tervonen O, Ojala R, Nieminen MT. (2009). Topographical variation of T2 relaxation time in the young adult knee cartilage at 1.5 T. *Osteoarthritis Cartilage*,17(12),1570-5.
- Hawker GA, Mian S, Bednis K, Stanaitis I. (2011). Osteoarthritis year 2010 in review: non-pharmacologic therapy. *Osteoarthritis Cartilage*,19(4),366-74.
- Hayashi D, Guermazi A, Hunter DJ. (2011). Osteoarthritis year 2010 in review: imaging. *Osteoarthritis Cartilage*,19(4),354-60.
- Haselgrove JC, Shapiro IM, Silverton SF. (1993). Computer modeling of the oxygen supply and demand of cells of the avian growth cartilage. *Am J Physiol*,265(2 Pt 1),C497-506.
- Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*,99(1),394.
- Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. (2003). Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop*,32(2),70-6. Review.
- Hoberg M, Aicher WK, Wülker N, Rudert M. (2006). Expression analysis of different collagens and cytokines in cartilage cells derived from arthrotic hip and knee joints. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*,144(3),289-95.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005). International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*,7(5),393-5.
- Hunter W. (1995). Of the structure and diseases of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*,317,3-6.
- Hunter DJ, Losina E, Guermazi A, Burstein D, Lasserre MN, Kraus V. (2010). A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. *Curr Drug Targets*, 11,536–45.
- Hunter DJ, Zhang W, Conaghan PG. (2011). Systematic review of the concurrent and predictive validity of MRI biomarkers in OA. *Osteoarthritis Cartilage*,19(5),557–588.
- Iannone F, Lapidula G. (2010). Obesity and inflammation--targets for OA therapy. *Curr Drug Targets*,11(5),586-98.
- Janderová L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. (2003). Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res*,11(1),65-74.

- Jarlov N. (2007). IRAP: A Treatment in Chronic Inflammation in Joints, Tendon Sheets and Bursa Podotrochlearis. In Proceedings XVII Tagung über Pferdekrankheiten. *Essen, Deutschland*.
- Jevsevar D. (2013). Treatment of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-Based Guideline, 2nd Ed. *J Am Acad Orthop Surg*, 2013,21 (9),571–6.
- Jones G, Ding C, Scott F, Glisson M, Cicuttini F. (2004). Early radiographic osteoarthritis is associated with substantial changes in cartilage volume and tibial bone surface area in both males and females. *Osteoarthritis Cartilage*,12(2),169-74.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Leeb B, Lequesne M, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Serni U, Swoboda B, Verbruggen G, Zimmerman-Gorska I, Dougados M; Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials ESCISIT. (2003). EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*,62(12),1145-55. Review.
- Joseph GB, Baum T, Carballido-Gamio J, Nardo L, Virayavanich W, Alizai H. (2011). Texture analysis of cartilage T2 maps: individuals with risk factors for OA have higher and more heterogeneous knee cartilage MR T2 compared to normal controls- data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Res Ther*,13(5),R153.
- Joseph GB, Baum T, Alizai H, Carballido-Gamio J, Nardo L, Virayavanich W, Lynch JA, Nevitt MC, McCulloch CE, Majumdar S, Link TM. (2012). Baseline mean and heterogeneity of MR cartilage T2 are associated with morphologic degeneration of cartilage, meniscus, and bone marrow over 3 years--data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*, 20(7),727-35.
- Joseph GB, McCulloch CE, Nevitt MC, Heilmeier U, Nardo L, Lynch JA, Liu F, Baum T, Link TM. (2015). A reference database of cartilage 3T MRI T2 values in knees without diagnostic evidence of cartilage degeneration: data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthritis Cartilage*,23(6),897-905.
- Jørgensen DR, Lillholm M, Genant HK, Erik B. Dam. (2013). On Subregional Analysis of Cartilage Loss from Knee MRI. *Cartilage*, 4(2),121–130.
- Jungmann PM. (2014). Cartilage Repair Surgery: Outcome Evaluation by using Noninvasive Cartilage Biomarkers Based on Quantitative MRI Techniques? *BioMed Res Int*, 2014:840170.
- Kato T, Miyake S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, and Ochi M. (2014). Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*,16(4),R163.
- Katz R. (2004). Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective. *NeuroRx*,1(2),189-95.
- Kavalkovich KW, Murphy JM, Barry FP. (2000). Adhesion of mesenchymal stem cells to fibrillated osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 8,S24.
- Keenan KE, Besier TF, Pauly JM, Han E, Rosenberg J, Smith RL, Delp SL, Beaupre GS, Gold GE. (2011). Prediction of glycosaminoglycan content in human cartilage by age, T1 ρ and T2 MRI. *Osteoarthritis Cartilage*,19(2),171-9.
- Kellgren JH, Lawrence JS. (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*,16(4),494–502.
- Kijowski R, Blankenbaker DG, Stanton PT, Fine JP, De Smet AA. (2006). Radiographic findings of osteoarthritis versus arthroscopic findings of articular cartilage degeneration in the tibiofemoral joint. *Radiology*,239,818-24.
- Kim HT, Zaffagnini S, Mizuno S, Abelow S, Safran MR. (2006). A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop Sports Phys Ther*,36(10),765-73.

- Kim T, Min BH, Yoon SH, Kim H, Park S, Lee HY, Kwack KS. (2014). An in vitro comparative study of T2 and T2* mappings of human articular cartilage at 3-Tesla MRI using histology as the standard of reference. *Skeletal Radiol*,43(7),947-54.
- Kirkley A, Birmingham TB, Litchfield RB, Giffin JR, Willits KR, Wong CJ, Feagan BG, Donner A, Griffin SH, D'Ascanio LM, Pope JE, Fowler PJ. (2008). A randomized trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*,359(11),1097-107.
- Kjaersgaard-Andersen P, Nafei A, Skov O, Madsen F, Andersen HM, Krøner K, Hvass I, Gjøderum O, Pedersen L, Branebjerg PE. (1990). Codeine plus paracetamol versus paracetamol in longer-term treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the hip. A randomised, double-blind, multi-centre study. *Pain*,43(3),309-18.
- Koh YG, Choi YJ. (2012). Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*,19(6),902-7.
- Koh YG, Jo SB, Kwon OR, Suh DS, Lee SW, Park SH, Choi YJ. (2013). Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*,29(4),748-55.
- Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, Kim YS, Yeo JE. (2015). Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*,23(5),1308-16.
- Kon E, Mandelbaum B, Buda R, Filardo G, Delcogliano M, Timoncini A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. (2011). Platelet-rich plasma intrarticular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis. *Arthroscopy*,27(11),1490-501.
- Kraus VB, Burnett B, Coindreau J. (2011). Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 19,515–542.
- Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Widmer M, Maravic M, Gómez-Barrena E, de Pina MF, Manno V, Torre M, Walter WL, de Steiger R, Geesink RG, Peltola M, Röder C. (2011). International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop*,35(12),1783-9.
- Laupattarakasem W, Laopaiboon M, Laupattarakasem P, Sumananont C. (2008). Arthroscopic debridement for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*,(1),CD005118.
- Le Blanc K, Tammik I, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 57,11-20.
- Le Blanc K, Ringdén O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*,262(5),509-525
- Le Pen C, Reygrobelle C, Gérentes I. (2005). Financial cost of osteoarthritis in France, the COART France Study. *Joint Bone Spine*,72(6),567-70.
- Lequesne MG, Mery C, Samson M, Gerard P. (1987). Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee: Validation-value in comparison with other assessment tests. *Scand J Rheumatol*,65,85-9.
- Levitt M. (2008). Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. New York, NY: Wiley; ISBN: 978-0-470-51117-6
- Li X, Pai A, Blumenkrantz G, Carballido-Gamio J, Link T, Ma B, Ries M, Majumdar S. (2009). Spatial Distribution and Relationship of T1p and T2 Relation times in knee cartilage with OA. *Magnetic Resonance in Medicine*,61(6),1310-18.
- Link TM. (2011). Cartilage as a biomarker. *Cartilage Imaging*, 16,205-11.
- Liu J, Song W, Yuan T, Xu Z, Jia W. (2014). A Comparison between Platelet-Rich Plasma (PRP) and Hyaluronate Acid on the Healing of Cartilage Defects. *PLoS One*, 9(5),e97293.

- Lorenz H, Richter W. (2006). Osteoarthritis: celular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cytochem*, 40,135-63.
- Magalon J. (2014). Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *Arthroscopy*, 30(5),629-38.
- Manheimer E, Cheng K, Linde K, Lao L, Yoo J, Wieland S, van der Windt DA, Berman BM, Bouter LM. (2010). Acupuncture for peripheral joint osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*,(1),CD001977.
- Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. (2010). Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant*,19(1),29-42.
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2005). New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*,34(6),6-8.
- Martinez-Zapata MJ, Orozco L, Balius R, Soler R, Bosch A, Rodas G, Til L, Peirau X, Urrútia G, Gich I, Bonfill X; PRP-RICE group. (2015). Efficacy of autologous platelet-rich plasma for the treatment of muscle rupture with haematoma: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Blood Transfus*,21,1-10.
- Maumus M, Jorgensen C, Noël D. (2013). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*, 95(12),2229–34.
- Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. (2010). Rapid isolation of human stem cells (connective progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *Am J Sports Med*, 38,1438-47.
- McAlindon TE. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*,22(3),363-88.
- McConell S. (2001). The Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC): A review of its utility and measurement properties. *Arthritis Rheum*, 45(5),453-61.
- McKenzie ME, Gurbel PA. (2001). The potential of monoclonal antibodies to reduce reperfusion injury in myocardial infarction. *BioDrugs*,15(6),395-404.
- Mcllwraith CW, Nixon AJ. (1996). Joint resurfacing: Attempts at repairing articular cartilage defects. In: Mcllwraith CW, Trotter GW (eds). Joint disease in the horse. Philadelphia. *WB Saunders Company*,317-334.
- Mcllwraith CW. (1996). General pathobiology of the joint and response to injury. In: Mcllwraith CW, Trotter GW. Joint disease in the horse. Philadelphia. *WB Saunders Company*,40-70.
- Mcllwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. (2011). Evaluation of intrarticular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy*,27(11),1552-61.
- Miller LE, Block JE. (2013). US-Approved Intraarticular Hyaluronic Acid Injections are Safe and Effective in Patients with Knee Osteoarthritis: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Saline-Controlled Trials. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*,6,57-63.
- Mitrovic D. (1987). Arthrose: perspectives et réalités. Paris. Masson,110-7.
- Moger CJ, Barrett R, Bleuet P, et al. (2007). Regional variations of collagen orientation in normal and diseased articular cartilage and subchondral bone determined using small angle X-ray scattering (SAXS). *Osteoarthritis Cartilage*,15,682–687.
- Monfort J, Garcia-Giralt N, López-Armada MJ, Monllau JC, Bonilla A, Benito P, Blanco FJ. (2006). Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res Ther*,8(5),R149.

- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP. (2002). A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*,347(2),81-8.
- Mosher TJ, Zhang Z, Reddy R, Boudhar S, Milestone B, Morrison W, Kwok CK, Eckstein F, Witschey WR, Borthakur A. (2011). Knee articular cartilage damage in osteoarthritis: analysis of MR image biomarker reproducibility in ACRIN-PA 4001 multicenter trial. *Radiology*,258(3),832-42.
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. (2003). Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis Rheum*,48(12),3464-74.
- Müller-Fassbender H, Bach GL, Haase W, Rovati LC, Setnikar I. (1994). Glucosamine sulfate compared to ibuprofen in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*,2(1),61-9.
- Nakajima H, Goto T, Horikawa O, Kikuchi T, Shinmei M. (1998). Characterization of the cells in the repair tissue of full-thickness articular cartilage defects. *Histochem Cell Biol*,109(4),331-8.
- Nauta AJ, Fibbe WE. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110(10), 3499-3506.
- Nieminen MT, Nissi MJ, Mattila L, Kiviranta I. (2012). Evaluation of chondral repair using quantitative MRI. *J Magn Reson Imaging*,36(6),1287-99.
- Nishimori M, Deie M, Kanaya A, Exham H, Adachi N, Ochi M. (2006). Repair of chronic osteochondral defects in the rat. *J Bone Joint Surg*,88(9),1236-44.
- Nishioka H, Hirose J, Nakamura E, Oniki Y, Takada K, Yamashita Y, Mizuta H. (2012). T1ρ and T2 mapping reveal the in vivo extracellular matrix of articular cartilage. *J Magn Reson Imaging*,35(1),147-55.
- Nissi MJ, Töyräs J, Laasanen MS, Rieppo J, Saarakkala S, Lappalainen R, Jurvelin JS, Nieminen MT. (2004). Proteoglycan and collagen sensitive MRI evaluation of normal and degenerated articular cartilage. *J Orthop Res*,22(3),557-64.
- Nissi MJ, Rieppo J, Töyräs J, Laasanen MS, Kiviranta I, Jurvelin JS, Nieminen MT. (2006). T(2) relaxation time mapping reveals age- and species-related diversity of collagen network architecture in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*,14(12),1265-71.
- Ocelus SM. (2000). Autologous cultured chondrocytes for the treatment of knee cartilage injury. *Orthop Nurs*,19,19-28.
- Oguchi T, Ishiguro N. (2004). Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-β, IL-1β and TNF-α. *Connect Tissue Res*,45,197-205.
- Oneto JM, Ellermann J, LaPrade RF. (2010). Longitudinal evaluation of cartilage repair tissue after microfracture using T2-mapping: a case report with arthroscopic and MRI correlation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*,18(11),1545-50.
- Orozco-L. (2009). Regeneración Ósea con Células progenitoras procedentes de medula ósea autóloga cultivadas "Ex Vivo" en bioreactor GMP. En "Medicina regenerativa e ingeniería tisular. Del laboratorio a la clínica". México, Alfil. ISBN: 978-607-7504-35-1
- Orozco-L. (2009). Nuevas aplicaciones clínicas del plasma rico en plaquetas. En "Medicina regenerativa e ingeniería tisular. Del laboratorio a la clínica". México, Alfil. ISBN: 978-607-7504-35-1
- Orozco L; Munar A; Soler R; Alberca M; Huguet M; Sentís J; Sánchez A; García-Sancho J. (2013). Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*,95(12),1535-1541.
- Orozco L, Soler R, Munar A. (2015). Tratamiento de la gonartrosis con células troncales mesenquimales. Fundamentos. Seguridad de uso. Legislación. Ensayos clínicos. *Arthros*, XI,Nº1.

- Otto WR, Rao J. (2004). Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*,37(1),97-110.
- Pham T, Van der Heijde D. (2003) Outcome variables for osteoarthritis clinical trials: the OMERACT-OARSI set of responder criteria. *J Rheumatol*, 30(7), 1648-54.
- Poole AR. (2003). What type of cartilage repair are we attempting to attain? *J Bone Joint Surg Am*, 85,40-4
- Pottie P, Presle N, Terlain B, Netter P, Mainard D, Berenbaum F. (2006). Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! *Ann Rheum Dis*,65(11),1403-5.
- Ranera B, Ordovas L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vazquez FJ, Osta R, Cons C et al. (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J*, 44(1),33-42.
- Rasmusson I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*,312,2169-79.
- Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, Abram F, Choquette D, Haraoui B. (2008). Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann Rheum Dis*, 67,683-8.
- Reeves BC, Wells GA. (2013). Special issue on inclusion of non-randomized studies in systematic reviews. *Res Synth Methods*,4(3),287-9
- Reiter DA, Irrechukwu O, Lin PC, Moghadam S, Von Thae S, Pleshko N, Spencer RG. (2012). Improved MR-based characterization of engineered cartilage using multiexponential T2 relaxation and multivariate analysis. *NMR Biomed*,25(3),476-88.
- Richette P. (2005). Arthrosis. *Rev Prat*,55,1933-42.
- Richette P. (2008). Généralités sur l'arthrose: épidémiologie et facteurs de risque. EMC (elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-003-C-20.
- Roberge R. (2003). Chronic acetaminophen toxicity. *J Emerg Med*,25(4),474.
- Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. (2007). Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*,15(12),137-77.
- Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. (1998). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage*,6:14-21.
- Rosenstein ED. (1999). Topical agents in the treatment of rheumatic disorders. *Rheum Dis Clin North Am*,25(4),899-918.
- Rousseau JCh, Garnero P. (2012). Biological markers in osteoarthritis. *Bone*,51(2),265-77.
- Rubio D, Garcia S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, Garcia-Castro J, Bernad A. (2008). Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One*,3(1),e1398.
- Rutjes AW, Nüesch E, Sterchi R, Jüni P. (2010). Therapeutic ultrasound for osteoarthritis of the knee or hip. *Cochrane Database Syst Rev*,(1),CD003132.
- Salzmann GM, Paul J, Bauer JS, Woertler K, Sauerschnig M, Landwehr S, Imhoff AB, Schöttle PB. (2009). T2 assessment and clinical outcome following autologous matrix-assisted chondrocyte and osteochondral autograft transplantation. *Osteoarthritis Cartilage*,17(12),1576-82.
- Samson DJ, Grant MD, Ratko TA, Bonnell CJ, Ziegler KM, Aronson N. (2007). Treatment of primary and secondary osteoarthritis of the knee. *Evid Rep Technol Assess*,(157),1-157.
- Sharma L, Kapoor D, Issa S. (2006). Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol*,18,147-56.
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. (1987). Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*,70(1),307-15.

- Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, Arnhold S, Desai B, Mehlhorn U, Schwinger RH, Staib P, Addicks K, Bloch W. (2006). Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*,24(7),1750-8.
- Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. (2002). Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol*,169(1),507-14.
- Smith JJ, Sorensen AG, Thrall JH. (2003). Biomarkers in imaging: realizing radiology's future. *Radiology*,227(3),633-8.
- Soler F, Soler R, Peirau X, Orozco L. (2012). Rapid isolation of human stem cells. *Arthroscopy*,28,895-96.
- Spandonis Y, Heese FP, Hall LD. (2004). High resolution MRI relaxation measurements of water in the articular cartilage of the meniscectomized rat knee at 4.7 T. *Magn Reson Imaging*,22(7),943-951.
- Spreafico A, Chellini F, Frediani B, Bernardini G, Niccolini S, Serchi T, Collodel G, Paffetti A, Fossombroni V, Galeazzi M, Marcolongo R, Santucci A. (2009). Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes. *J Cell Biochem*,108(5),1153-65.
- Stehling C, Liebl H, Krug R, Lane NE, Nevitt MC, Lynch J, McCulloch CE, Link TM. (2010). Patellar cartilage: T2 values and morphologic abnormalities at 3.0-T MR imaging in relation to physical activity in asymptomatic subjects from the osteoarthritis initiative. *Radiology*,254(2),509-20.
- Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2011;39(10):2135-40.
- Sundman EA, Cole BJ, Karas V, Della Valle C, Tetreault MW, Mohammed HO, Fortier LA. (2014). The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *Am J Sports Med*,42(1),35-41.
- Surowiec RK, Lucas EP, Fitzcharles EK, Petre BM, Dornan GJ, Giphart JE, LaPrade RF, Ho CP. (2014). T2 values of articular cartilage in clinically relevant subregions of the asymptomatic knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*,22(6),1404-14.
- Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. (2005). Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant*,14(9),683-93. Erratum in: (2006). *Cell Transplant*,15(4),367
- Taylor SE, Weaver MP, Pitsillides AA, Wheeler BT, Wheeler-Jones CP, Shaw DJ, Smith RK. (2006). Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. *Equine Vet J*,38(6),502-7.
- Taylor C, Carballido-Gamio J, Majumdar S, Li X. (2009). Comparison of quantitative imaging of cartilage for osteoarthritis: T2, T1rho, dGEMRIC and contrast-enhanced computed tomography. *Magn Reson Imaging*,27(6),779-84.
- Torzilli PA, Grigiene R, Borrelli J Jr, Helfet DL. (1999). Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. *J Biomech Eng*,121(5),433-41.
- Trattng S, Welsch GH, Juras V, Szomolanyi P, Mayerhoefer ME, Stelzeneder D, Mamisch TC, Bieri O, Scheffler K, Zbyn S. (2010). ²³Na MR imaging at 7T after knee matrix-associated autologous chondrocyte transplantation: preliminary results. *Radiology*,257(1),175-84.
- Trattng S, Winalski CS, Marlovits S, Jurvelin JS, Welsch GH, Potter HG. (2011). Magnetic Resonance Imaging of Cartilage Repair: A Review. *Cartilage*,2(1),5-26.
- Trattng S, Ohel K, Mlynarik V, Juras V, Zbyn S, Korner A. (2015). Morphological and compositional monitoring of a new cell-free cartilage repair hydrogel technology -GelrinC by MR using semi-quantitative MOCART scoring and quantitative T2 index and new zonal T2 index calculation. *Osteoarthritis Cartilage*, 23(12),2224-32.

- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. (2003). Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75,389-97.
- Turner L, Knoepfler P. (2016) Selling Stem Cells in the USA: Assessing the Direct-to-Consumer Industry. *Cell Stem Cell*. Advanced online publication. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.007>
- Van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, Van Beuningen HM. (2001). Growth factors and cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*,391,S244-50. Review.
- Van Miert AS. (2002). Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Vet Res Commun*,26(2),111-26. Review
- Van Weeren PR, Firth EC. (2008). Future tools for early diagnosis and monitoring of musculoskeletal injury: biomarkers and CT. *Vet Clin North Am Equine Pract*,24(1),153-75.
- Vaquerizo V, Plasencia MÁ, Arribas I, Seijas R, Padilla S, Orive G, Anitua E. (2013). Comparison of intrarticular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*,29(10),1635-43.
- Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg*,37(8),713-24.
- Vinyals L. 2012. Evaluación de la respuesta "In Vitro" de condrocitos humanos tratados con plasma rico en plaquetas en presencia de LPS o en condiciones de estrés oxidativo Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.
- Vives J. Repair of chondral defects and meniscus using autologous mesenchymal stem cells. A preliminary study in sheep. 9th Congress ICRS 2010.
- Watrín-Pinzano A. (2004). T2 mapping: an efficient MR quantitative technique to evaluate spontaneous cartilage repair in rat patella. *Osteoarthritis Cartilage*,12(3),191-200.
- Watrín-Pinzano A, Ruaud JP, Olivier P, Grossin L, Gonord P, Blum A, Netter P, Guillot G, Gillet P, Loeuille D. (2005). Effect of proteoglycan depletion on T2 mapping in rat patellar cartilage. *Radiology*,234(1),162-70.
- Welsch GH, Mamisch T, Domayer S, Dorotka R, Kutscha-Lissberg F, Marlovits S, White L, Trattnig S. (2008). Cartilage T2 Assessment at 3-T MR Imaging: In Vivo Differentiation of Normal Hyaline Cartilage from Reparative Tissue after Two Cartilage Repair Procedures—Initial Experience. *Musculoskeletal Imaging*,247(1),154-161.
- Welsch GH, Mamisch TC, Marlovits S. (2009). Quantitative T2 mapping during follow-up after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT): full-thickness and zonal evaluation to visualize the maturation of cartilage repair tissue. *Journal of Orthopaedic Research*, 27 (7),957-63.
- Welsch GH, Mamisch TC, Zak L, Mauerer A, Apprich S, Stelzeneder D, Marlovits S, Trattnig S. (2011). Morphological and biochemical T2 evaluation of cartilage repair tissue based on a hybrid double echo at steady state (DESS-T2d) approach. *J Magn Reson Imaging*, 34(4),895-903.
- Welsch GH, Apprich S, Zbyn S, Mamisch TC, Mlynarik V, Scheffler K, Bieri O, Trattnig S. (2011). Biochemical (T2, T2* and magnetisation transfer ratio) MRI of knee cartilage: feasibility at ultra-high field (7T) compared with high field (3T) strength. *Eur Radiol*,21(6),1136-43.
- Wiener E, Pfirrmann C. (2010). Spatial variation in T₁ of healthy human articular cartilage of the knee joint. *Br J Radiol*, 83(990),476–85.
- Wirth W, Hellio Le Graverand MP, Wyman BT, Maschek S, Hudelmaier M, Hitzl W, Nevitt M, Eckstein F; OAI Investigator Group. (2009). Regional analysis of femorotibial cartilage loss in a subsample from the Osteoarthritis Initiative progression subcohort. *Osteoarthritis Cartilage*,17(3),291-7.

- Wirth W, Larroque S, Davies RY, Nevitt M, Gimona A, Baribaud F, Lee JH, Benichou O, Wyman BT, Hudelmaier M, Maschek S, Eckstein F. (2011). OA Initiative Investigators Group. Comparison of 1-year vs 2-year change in regional cartilage thickness in osteoarthritis results from 346 participants from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*,19(1),74-83.
- Witt C, Brinkhaus B, Jena S, Linde K, Streng A, Wagenpfeil S, Hummelsberger J, Walther HU, Melchart D, Willich SN. (2005). Acupuncture in patients with osteoarthritis of the knee: a randomised trial. *Lancet*,366(9480),136-43.
- Wong CS, Yan CH, Gong NJ, Li T, Chan Q, Chu YC. (2013). Imaging biomarker with T1ρ and T2 mappings in osteoarthritis - in vivo human articular cartilage study. *Eur J radiol*,82(4),647-50.
- Wu W, Billingham C, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M. (2002). Sites of collagenases cleavage and desnaturation of type II collagen in agin and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinasa 1 and matrix metalloproteinasa 13. *Arthritis Rheum*,46,2087-94.
- Xia Y. (2013). MRI of articular cartilage at microscopic resolution. *Bone Joint Res*,2(1),9-17.
- Xie X, Zhang Ch. (2014). Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther*, 16(1),204.
- Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, Ashraf M, Xu M. (2015). Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol*,182,349-60.
- Zavadil DP, Satterle CC, Costigan JM, Holt DW, Shostrom VK. (2007). Autologous platelet gel and platelet-poor plasma reduce pain with total shoulder arthroplasty. *J Extra Corpor Technol*,39(3),177-82.
- Zeng HL, Zhong Q, Qin YL, Bu QQ, Han XA, Jia HT, Liu HW. (2011). Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*,12,32.
- Zscharnack M, Poesel C, Galle J, Bader A. (2009). Low oxygen expansion improves subsequent chondrogenesis of ovine bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogel. *Cells Tissues Organs*,190(2),81-93.

ANEXOS

Anexo I	TREND Checklist
Anexo II	Gráficos Cartigram por paciente y grupo
Anexo III	Aprobación del CEIC
Anexo IV	Publicaciones

ANEXO I

TREND Checklist

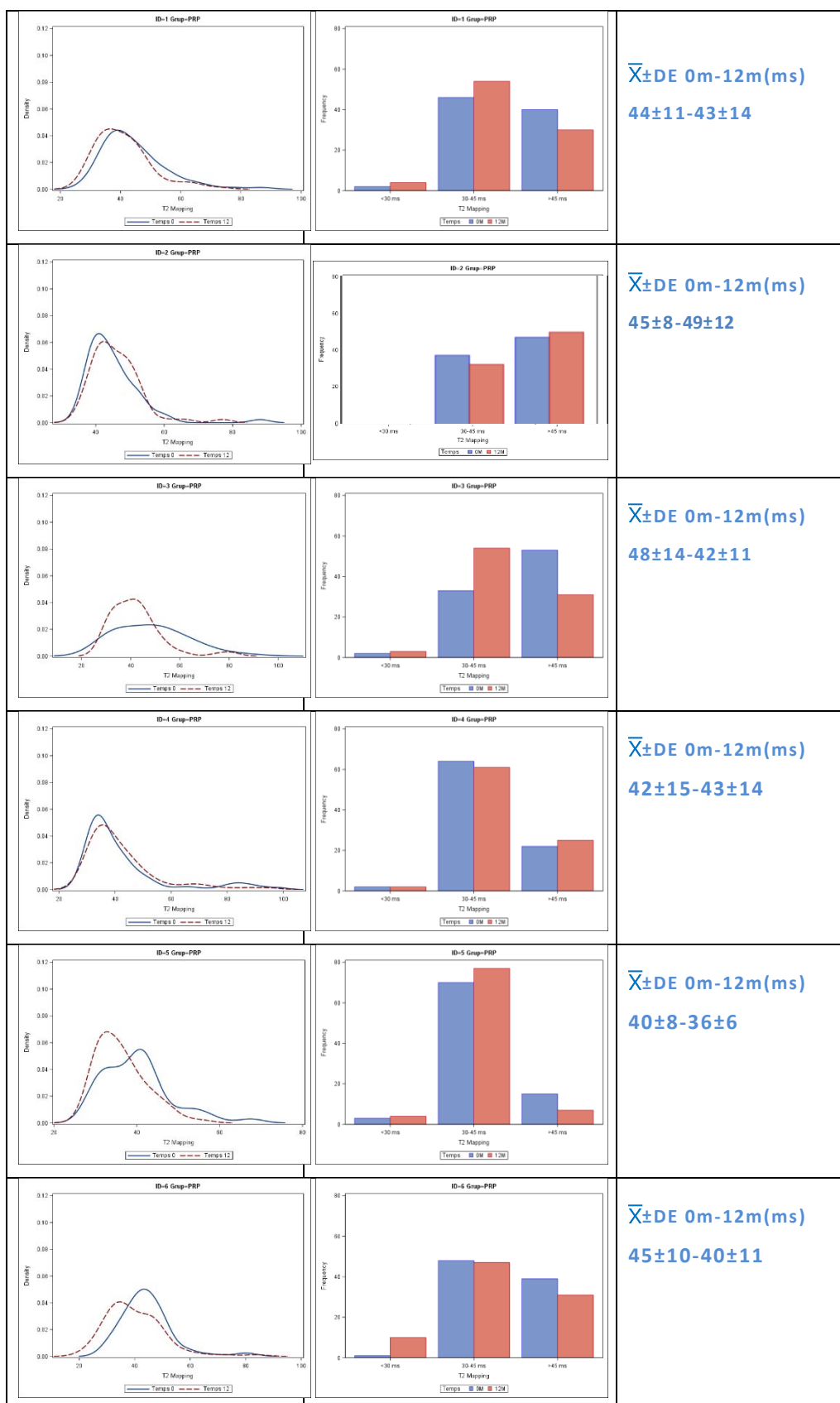
Sección	Nº	Descripción	Página
TÍTULO Y ABSTRACT			
Titulo y Abstract	1	Información sobre asignación de intervenciones	IV
		Abstract estructurado	IV
		Información sobre la población en estudio	IV
INTRODUCCIÓN			
Antecedentes	2	Antecedentes y explicación	1-13
		Teorías en las que se basan las intervenciones	37-46
MÉTODOS			
Participantes	3	Criterios de Inclusión	54
		Métodos de reclutamiento (recomendados, auto-seleccionados) incluyendo método de sistematización	53-55
		Lugares en los que se recolectaron los datos	1
Intervenciones	4	Detalles de los tratamientos, incluyendo:	
		Tratamiento administrado	53-55
		Método de administración	53-55
		Dosis administrada	53-55
		Quién administró el tratamiento	64/71
		Dónde se administró	64/71
		Cuántas veces se administró	53-55
Actividades dirigidas a incrementar el cumplimiento (incentivos)	—		
Objetivos	5	Objetivos e hipótesis	49-51
Resultados	6	Medidas de resultados	73-86
		Métodos usados para recabar datos y cualquier medida tomada para incrementar la calidad de las mediciones	61-63
		Información sobre los instrumentos de medida utilizados	26/63 + 61-62
Tamaño Muestral	7	Cómo se determina el tamaño de la muestra	3/53
Método de asignación	8	Unidad de asignación (individuo, grupo, comunidad)	55
		Método usado para asignar unidades a tratamientos (estratificación...)	55
		Inclusión de aspectos para minimizar sesgos debidos a la falta de aleatorización (emparejamiento...)	3/61-62

Cegamiento	9	Fueron cegados los participantes, administrador del tratamiento o los evaluadores de los resultados. Si se hizo, se explica cómo y cómo fue evaluado?	2
Unidad de Análisis	10	Unidad mínima de análisis (individuo, grupo...) Si la unidad de análisis difiere de la unidad de asignación, qué medidas se han utilizado para solucionarlos (ajustando el error estándar o usando análisis multinivel)	56 56
Métodos estadísticos	11	Métodos estadísticos usados para comparar grupos, incluyendo métodos complejos de datos apareados (correlated data) Métodos estadísticos adicionales, como análisis de subgrupos o análisis ajustados Métodos para datos desaparecidos Software y programas utilizados	61-62 63-64 62 61
RESULTADOS			
Flujo de Participantes	12	Participantes visitados en cada fase del estudio (reclutamiento, asignación, tratamiento, seguimiento y análisis. (diagrama si es posible) Reclutamiento nº participantes vistos para inclusión, descartados, no aceptaron, reclutados) Asignación nº participantes de cada grupo Intervención: nº1 participantes que recibió tratamiento en cada grupo Seguimiento: nº participantes que completaron el período de seguimiento Análisis: nº participantes analizados o excluidos del análisis por grupo Descripción de las desviaciones del protocolo y razones	55 55 55 55 55/57 55 _____
Reclutamiento	13	Especificar periodos de reclutamiento y seguimiento	55
Características basales	14	Características basales de los participantes de cada grupo	72
Equivalencias	15	Métodos estadísticos usados para controlar las diferencias entre las características basales	62
Análisis	16	Número de participantes analizado por cada grupo Especificar si los no cumplidores fueron incluidos en el análisis	53 53
Resultados y estimaciones	17	Para cada medida de resultado, un resumen de los resultados para cada tratamiento, especificando el intervalo de confianza para indicar el nivel de precisión Inclusión de resultados nulos o negativos Inclusión de resultados preliminares de estudios previos en los que se basa el tratamiento en estudio	73-86 75 Publicac anexas
Análisis auxiliares	18	Resumen de análisis adicionales, incluyendo subgrupos o análisis parciales, indicando cuáles fueron pre-especificados y cuáles exploratorios	84-85
Acontecimientos adversos	19	Resumen de acontecimientos adversos o efectos indeseados para cada grupo	57

DISCUSIÓN			
Interpretación	20	Interpretación de los resultados, teniendo en cuenta la hipótesis, potenciales sesgos, imprecisión de las mediciones y otras posibles debilidades del estudio	87-92
		Discusión de los resultados teniendo en cuenta el supuesto mecanismo de acción de cada uno de los tratamientos o explicar mecanismos alternativos	87-92
		Discusión de el éxito del tratamiento, inconvenientes y dificultades de implementación (llevar a cabo) el tratamiento	87-92
		Discusión de la investigación e implicaciones para terapias en el futuro	87-92
Generalización	21	Validez externa de los hallazgos del estudio, teniendo en cuenta la población del estudio, las características de la intervención, duración del seguimiento, incentivos, y otros temas que ayuden a contextualizar los resultados del tratamiento.	92
Evidencia	22	Interpretación general de los resultados en el contexto de la evidencia y conocimiento actuales	+1

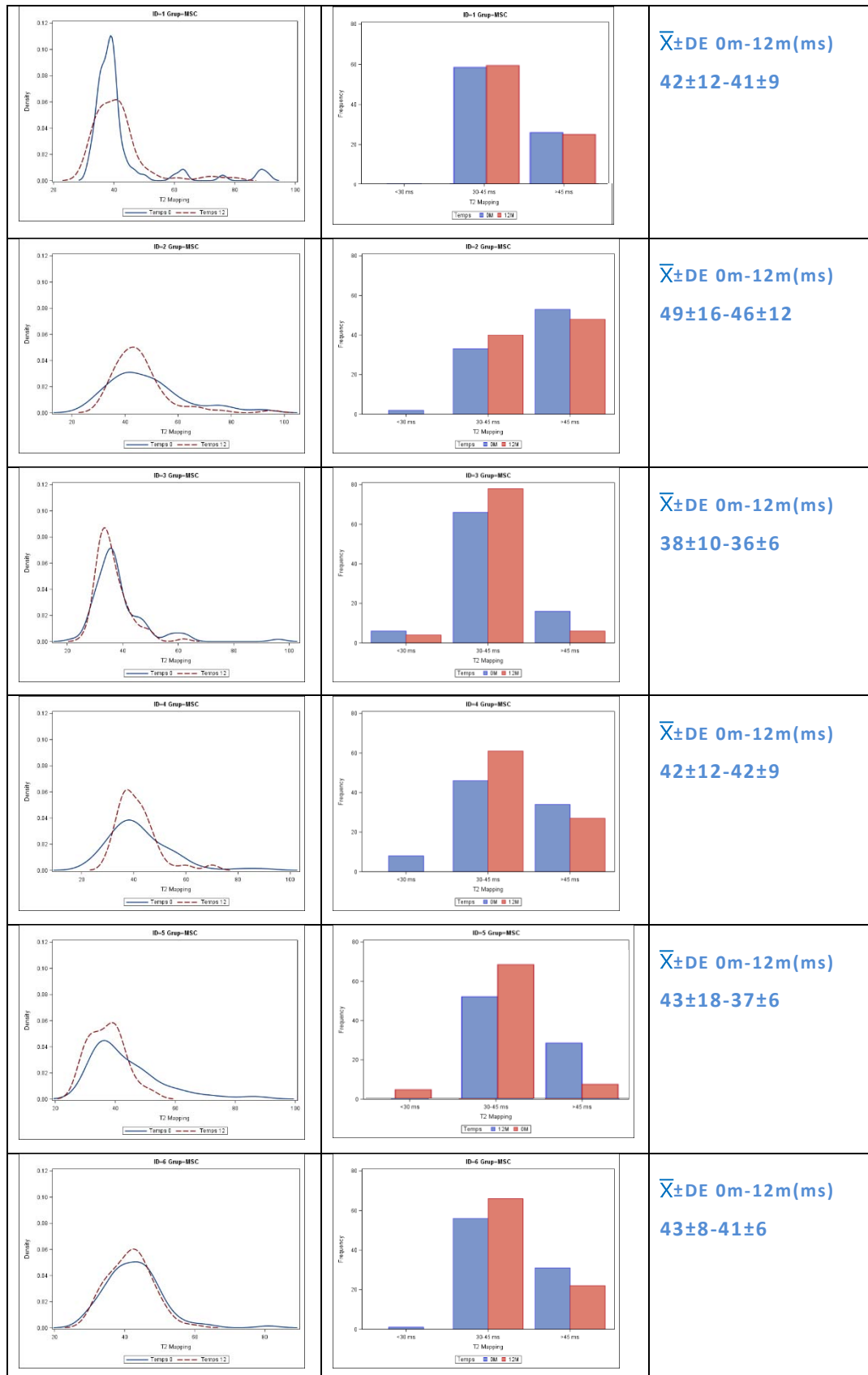
ANEXO II

GRÁFICOS INDIVIDUALES (DE) Y DISTRIBUCIÓN ROI Grupo PRP



		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 36±4-32±7</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 46±11-45±12</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 50±14-52±16</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 39±8-39±7</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 36±4-36±6</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 37±6-35±6</p>

GRÁFICOS INDIVIDUALES (DE) Y DISTRIBUCIÓN ROI Grupo MSC



		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 33±8-34±5</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 47±12-39±7</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 47±18-41±12</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 43±13-40±6</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 39±12-36±7</p>
		<p>$\bar{X} \pm DE$ 0m-12m(ms) 43±16-43±12</p>

ANEXO III

APROBACIÓN DEL CEIC

ANEXO IV

PUBLICACIONES

Orozco LI, **Munar A**, Soler R, Alberca M, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J. (2013) Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*, 95(12), 1535-1541.

Orozco LI, **Munar A**, Soler R, Alberca M, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J. (2014). Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Mesenchymal Stem Cells: Two-Year Follow-up Results. *Transplantation*, 97(11), letter.

Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, **Munar A**, Orozco L, Soler R, Fuertes JJ, Huguet M, Sánchez A, García-Sancho J (2015). Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial. *Transplantation*, 99(8), 1681-1690.

Soler R, Orozco L, **Munar A**, Huguet M, López R, Vives J, Coll R, Codinach M, García López J. (2015). Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.knee.2015.08.013>.

Soler R, **Munar A**, Soler F, Peirau X, Huguet M. (2015). Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: 50 Cases Clinical and MRI Results at One Year FollowUp. *J Stem Cell Res Ther*, 5, 285. doi:10.4172/2157-7633.1000285.

Orozco L, Soler R, **Munar A**. (2015). Tratamiento de la gonartrosis con células troncales mesenquimales. Fundamentos. Seguridad de uso. Legislación. Ensayos clínicos. *Arthros*, XI.Nº.

Orozco LI, **Munar A**, Soler R, Alberca M, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J. (2013) Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*, 95(12), 1535-1541.

MATERIAL SUPLEMENTARIO del artículo:

Orozco LI, **Munar A**, Soler R, Alberca M, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J. (2013)
Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study.
Transplantation, 95(12), 1535-1541

Orozco LI, **Munar A**, Soler R, Alberca M, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J. (2014). Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Mesenchymal Stem Cells: Two-Year Follow-up Results. *Transplantation*, 97(11), letter.

Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, **Munar A**, Orozco L, Soler R, Fuertes JJ, Huguet M, Sánchez A, García-Sancho J (2015). Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial. *Transplantation*,99(8), 1681-1690.

Soler R, Orozco L, **Munar A**, Huguet M, López R, Vives J, Coll R, Codinach M, García López J. (2015). Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.knee.2015.08.013>.

Soler R, **Munar A**, Soler F, Peirau X, Huguet M. (2015). Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: 50 Cases Clinical and MRI Results at One Year FollowUp. *J Stem Cell Res Ther*, 5, 285. doi:10.4172/2157-7633.1000285.

Orozco L, Soler R, **Munar A.** (2015). Tratamiento de la gonartrosis con células troncales mesenquimales. Fundamentos. Seguridad de uso. Legislación. Ensayos clínicos. *Arthros*, XI.Nº